

# HIF-1 $\alpha$ 沉默联合甲基硒酸对宫颈癌细胞增殖与凋亡的影响及其机制探究

李振豪<sup>1</sup>, 候耀峰<sup>1</sup>, 黎灵<sup>1</sup>, 黄轩宇<sup>1</sup>, 刘婉榆<sup>1</sup>, 张爱霞<sup>2</sup>, 王楠<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 基因沉默联合甲基硒酸(MSA)对宫颈癌细胞增殖、凋亡及迁移的影响及分子机制。方法 采用脂质体法将 HIF-1 $\alpha$  干扰 RNA 和阴性对照 RNA 分别转染海拉细胞(HeLa), 转染 48 h 后用 MSA 处理细胞 24 h, CCK-8 法和克隆形成实验检测细胞增殖情况; 流式细胞法检测细胞凋亡情况; Western blot 实验检测 HIF-1 $\alpha$ 、Bcl-2、E-cadherin 蛋白表达水平; Transwell 实验检测细胞迁移能力; RNA-seq 分析差异表达基因和差异信号通路。结果 与对照组相比, 干扰 HIF-1 $\alpha$  联合 MSA 抑制细胞增殖( $P < 0.01$ ); 流式细胞检测结果表明, 联合用药组可诱导细胞凋亡; Transwell 和 Western blot 结果表明, 干扰 HIF-1 $\alpha$  联合 MSA 能够抑制 HeLa 细胞迁移, 并且下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 E-cadherin 蛋白表达。mRNA 测序结合信号通路富集结果显示凋亡信号通路及下游基因的表达受到抑制。结论 HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 药物处理能够协同抑制宫颈癌细胞增殖, 诱导癌细胞凋亡, 其调控机制可能与 Bcl-2 家族蛋白的表达和 p53 信号通路抑制相关。

**关键词** 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 甲基硒酸; 宫颈癌; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号 Q 255

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1954-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.018

硒是一种人体必需的微量元素, 在肿瘤领域被广泛研究, 硒的抗肿瘤作用取决于硒的形式、剂量、肿瘤发展阶段以及肿瘤类型等因素<sup>[1]</sup>。甲基硒酸(methylselenenic acid, MSA) 是有机硒小分子化合物, 可以有效、选择性地杀伤多种肿瘤细胞<sup>[2-3]</sup>, 其作用于肺癌细胞后, 可以调控细胞周期相关基因, 进

而抑制细胞生长和诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。在乳腺癌中, MSA 与化疗药物联合使用具有明显的化疗增敏作用<sup>[5]</sup>。硒还能够调节肿瘤细胞中凋亡基因的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>。此外, MSA 的抗肿瘤作用也在裸鼠移植瘤模型中被验证<sup>[7-8]</sup>。以上研究表明 MSA 具有一定的抗肿瘤作用, 但其对于不同肿瘤的抗癌效果和作用机制仍需进一步阐明。

在宫颈癌实体肿瘤中, 氧分压的降低使缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 无法完成羟基化而被激活, 诱导肿瘤新血管形成, 使 HIF-1 $\alpha$  在宫颈癌组织中呈现高表达<sup>[9]</sup>。该实验主要以中国常见肿瘤宫颈癌为主要研究对象, 围绕 MSA 联合 HIF-1 $\alpha$  沉默对宫颈癌发生发展的作用展开, 结合转录组学, 探讨 HIF-1 $\alpha$  沉默联合甲基硒酸药物对宫颈癌的作用机制, 以期更好地诠释硒的抗肿瘤作用机制, 为宫颈鳞状细胞癌患者的治疗提供新的思路和理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 宫颈癌 HeLa 细胞株购自中科院上海细胞库; DMEM、青-链霉素购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 胰酶(含 EDTA) 购自北京索莱宝公司; 胰酶(不含 EDTA) 购自美国 Gibco 公司; 细胞凋亡试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司; MSA 购自美国 Sigma 公司; Cell Counting Kit-8 购自广州 GLP BIO 公司; siRNA-HIF-1 $\alpha$  购自广州锐博生物技术有限公司; GAPDH、Bcl-2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;  $\alpha$ -Tubulin 抗体购自美国 Abcam 公司; HIF-1 $\alpha$  抗体购自武汉 Proteintech 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 蛋白 Marker 购自美国 Promega 公司; 辣根过氧化物酶化学发光底物购自美国 Promega 公司。

**1.2 细胞培养与 siRNA 转染** 将 HeLa 细胞接种于含 10% 胎牛血清, 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基中, 置于低氧培养箱中培养。HIF-1 $\alpha$  有效靶向 siRNA 序列为: 5'-CCAGCAACTTGAGGAAGTA-3', 5'-GGAA-CATGATGGTTCACCTT-3', 5'-CTACCCACATACATAA-

2022-09-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81502257); 广东大学生科技创新培育专项资金资助项目(编号: pdjh2020a0547)

作者单位: <sup>1</sup> 嘉应学院生命科学学院 梅州 514015

<sup>2</sup> 广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广州 510640

作者简介: 李振豪, 男, 本科生;

张爱霞, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: 907265887@qq.com;

王楠, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: wangnan@jyu.edu.cn

AGA-3'。使用与已知人类基因没有同源性的序列作为阴性对照组 (si-NC 组)。利用脂质体法将 siRNA-HIF-1 $\alpha$  和 si-NC 转染至 HeLa 细胞中, 6 h 后将 OMEM 培养基换成 DMEM 继续培养 48 h 后进行后续实验。MSA 加入细胞的终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

**1.3 Western blot 实验** 细胞转染后, 加入 MSA (终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 24 h 后用 RIPA 法提取细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳, 电泳后转至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入兔抗 HIF-1 $\alpha$  抗体孵育 12 h, 最后用 HRP 的鼠抗兔 IgG 孵育 2 h, 在多功能凝胶成像系统显影, 检测对照组与实验组 HIF-1 $\alpha$ 、Bcl-2 及 E-cadherin 等蛋白的表达。

**1.4 Annexin V-FITC/PI 实验** 将转染后 48 h 的细胞加入 MSA (终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次消化后, 加入 500  $\mu\text{l}$  Binding Buffer 后取出 100  $\mu\text{l}$  加入 Annexin V 5  $\mu\text{l}$  避光 5 min, 再加入 10  $\mu\text{l}$  PI, 最后加入 400  $\mu\text{l}$  PBS 缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**1.5 CCK-8 实验** 取对数生长期转染后的细胞进行稀释, 接种于 96 孔板中, 每个孔 100  $\mu\text{l}$  (细胞 1 000 个/孔)。每组设 3 个复孔, 并设空白对照组。待细胞贴壁后, 加入 MSA (浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 继续培养 12、24、36 和 48 h 后, 每个孔加入含 10% CCK-8 的 DMEM 100  $\mu\text{l}$ , 于培养箱中培养 1~4 h, 酶标仪测其 450 nm 处 OD 值, 实验重复 3 次。

**1.6 Transwell 实验** 将对数生长期的细胞消化, 用无血清的高糖 DMEM 重悬, 调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/ml, 取细胞悬液 200~300  $\mu\text{l}$  于 Transwell 小室中, 小室下层加入 500  $\mu\text{l}$  含 20% 血清的 DMEM 培养基, 细胞常规培养 24 h 后, 迁移至滤膜下层的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫室温染色

30 min 后, 显微镜下观察不同处理组细胞的迁移情况并拍照。

**1.7 细胞克隆形成实验** 将对数生长期的细胞调整浓度后接种于 6 孔板 (细胞 1 000 个/孔), 培养 1 周后加入 MSA (浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 继续培养 1 周用 PBS 洗涤 2 次, 加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 30~60 min, 固定后加入 0.1% 结晶紫染色液室温染色 2 h, PBS 缓冲液洗净后晾干, 在多功能凝胶成像系统拍照, 分析结果。

**1.8 GO 和 KEGG 富集分析** 将 HIF-1 $\alpha$  沉默联合 MSA 为实验组细胞与空白对照组细胞分别用 TRIzol 法收集细胞, 高通量测序分析, 测序得到的原始数据通过 HISAT2 软件进行序列比对, 并进行基因组定位分析。以  $|\log_2\text{FC}| \geq 1$  ( $P < 0.05$ ) 作为显著差异表达基因, 结合 GO 和 KEGG 数据库对筛选获得的显著差异表达基因进行功能注释和通路富集分析。

**1.9 统计学处理** 应用 GraphPad Prism 7.0 进行图表制作分析, 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据比较采用  $t$  检验和 One-way ANOVA 分析, 实验独立重复 3 次, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MAS 联合 HIF-1 $\alpha$  沉默对 HeLa 细胞增殖的影响** CCK-8 实验检测结果显示, MSA 或 HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 药物处理组与对照组相比均能抑制 HeLa 细胞的生长, 并且 HIF-1 $\alpha$  联合 MSA 组作用效果较好, 差异均有统计学意义 ( $F = 0.8635$ ,  $P < 0.05$ )。克隆形成实验表明, MSA 联合 siHIF-1 $\alpha$  组的细胞克隆形成少于其对应的对照组和 MSA 药物组, 说明 siHIF-1 $\alpha$  联合 MSA 抑制了细胞增殖 ( $F = 313.9$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1 和表 1。

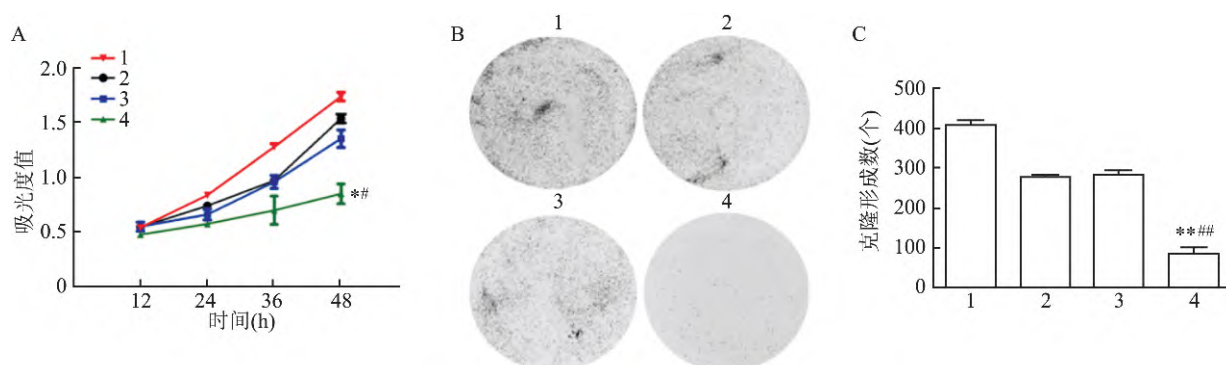


图1 MSA联合siHIF-1 $\alpha$ 对HeLa细胞增殖的影响

A: CCK-8 法检测细胞增殖; B: 细胞克隆形成, 结晶紫染色  $\times 100$ ; C: 细胞克隆形成细胞数量统计分析; 1: CON 组; 2: MSA 组; 3: MSA + siNC 组; 4: MSA + siHIF-1 $\alpha$  组; 与 MSA 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MSA + siNC 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

表1 各组细胞的克隆形成情况 ( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	克隆形成数目(个)
CON	413 ± 29
MSA	277 ± 15
MSA + siNC	293 ± 19 **
MSA + siHIF-1 $\alpha$	87 ± 31 **

与 MSA 组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 沉默联合 MSA 对细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,与对照组相比,单独 MSA 药物处理和 HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 处理组细胞凋亡比例增加, siHIF-1 $\alpha$  联合 MSA 组细胞凋亡率为 19.3%, 差异有统计学意义 ( $F = 95.07, P < 0.01$ )。见图 2A、B 和表 2。

表2 各组细胞的凋亡率情况 ( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率(%)
CON	4.23 ± 1.35
MSA	10.37 ± 3.26
MSA + siNC	15.33 ± 1.95 **
MSA + siHIF-1 $\alpha$	24.47 ± 3.51 **

与 MSA 组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.3 HIF-1 $\alpha$  沉默联合 MSA 对 HeLa 细胞迁移能力的影响** 与对照组相比, HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 处理 HeLa 细胞 24 h 后穿过 Transwell 的细胞数减少, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{迁移}} = 66.13, F_{\text{侵袭}} = 47.52, P < 0.05$ ) 结果表明 MSA 药物联合 siHIF-1 $\alpha$  对细胞侵袭具有抑制作用, 如图 3 所示。

**2.4 HIF-1 $\alpha$  沉默联合 MSA 影响迁移相关蛋白的表达** 不同浓度的 MSA (5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用于细胞 24 h 后, 各组细胞形态变化如图 4A 所示。对照组细胞呈扁平且长梭形, 细胞连接紧密且贴壁良好, 经过药物 MSA 处理 24 h 后, HeLa 细胞形态发生改变, 细胞呈圆形或变方, 细胞之间连接较松散, 并且随着 MSA 浓度的增加, 细胞表现出间质样特征。HIF-1 $\alpha$  敲低后的细胞加 MSA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后, Western blot 实验检测各组细胞中迁移相关蛋白的表达。与对照组相比, HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 上调 E-cadherin 表达, 并降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达(图 4B、C) 提示 HIF-1 $\alpha$  基因沉默联合 MSA 可能通过影响 Bcl-2 家族来发挥促宫颈癌细胞凋亡的作用。

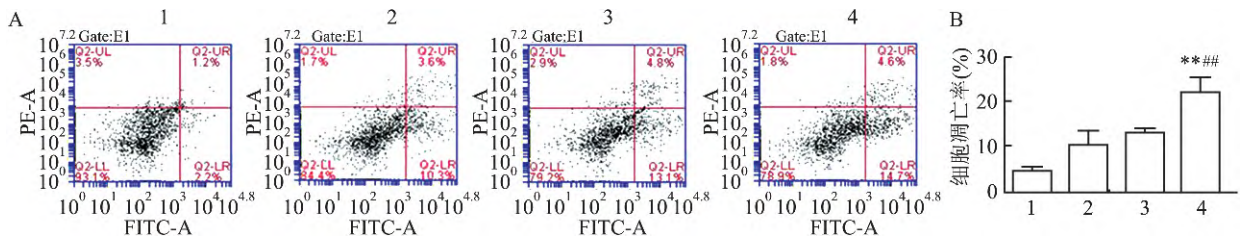


图2 Annexin V-FITC/PI 双染色检测各组肿瘤细胞的凋亡情况

A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: 各组细胞凋亡率统计分析; 1: CON 组; 2: MSA 组; 3: MSA + siNC 组; 4: MSA + siHIF-1 $\alpha$  组; 与 MSA 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MSA + siNC 组比较: ##  $P < 0.01$

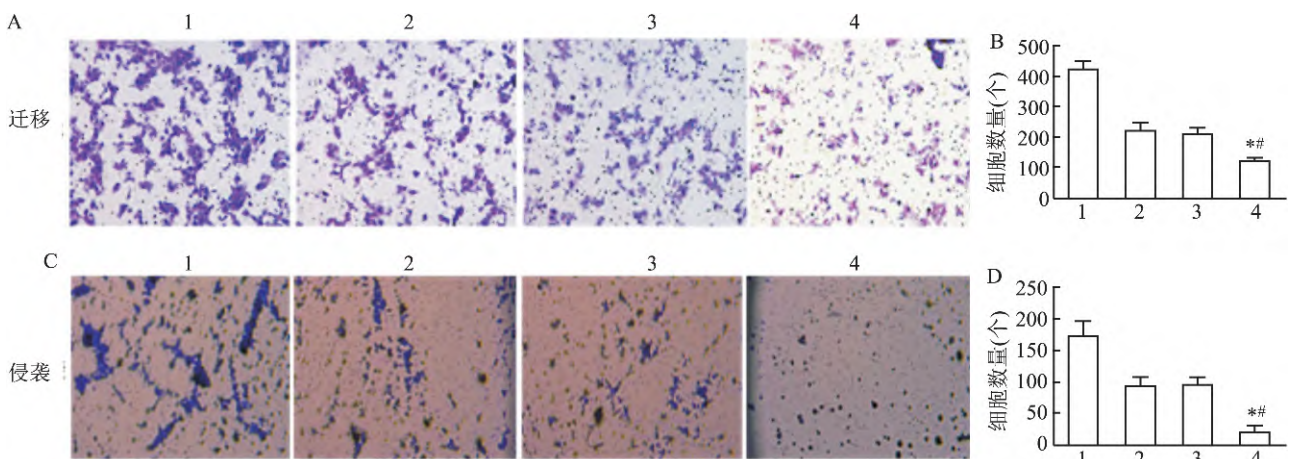


图3 MSA 联合 siHIF-1 $\alpha$  对 HeLa 细胞体外迁移能力的检测

A、C: Transwell 法检测细胞迁移能力结晶紫染色  $\times 100$ ; B、D: 细胞迁移数量统计分析; 1: CON 组; 2: MSA 组; 3: MSA + siNC 组; 4: MSA + siHIF-1 $\alpha$  组; 与 MSA 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 MSA + siNC 组比较: #  $P < 0.05$

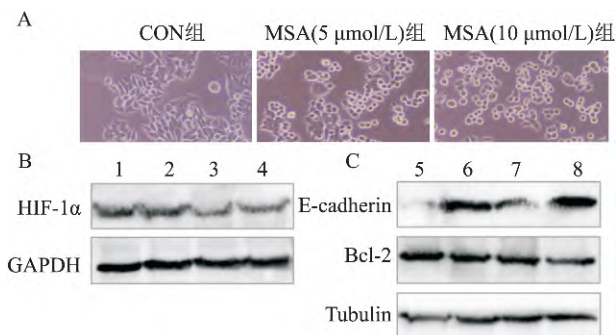


图4 不同浓度MSA作用HeLa细胞24h后形态变化和Western blot实验检测不同处理组细胞的蛋白表达情况

A: MSA对HeLa细胞形态影响×100; B: Western blot法检测HIF-1α沉默效果; C: Western blot法检测细胞中迁移相关蛋白; 1: siNC组; 2: HIF-1αsiRNA-1组; 3: HIF-1αsiRNA-2组; 4: HIF-1αsiRNA-3组; 5: CON组; 6: MSA组; 7: MSA+siNC组; 8: MSA+siHIF-1α组

**2.5 HIF-1α联合MSA通过抑制p53信号通路影响细胞的增殖和迁移** 为进一步探索HIF-1α联合MSA影响宫颈癌细胞增殖和迁移的分子机制, mRNA测序结合基因富集分析、GO功能注释分析与KEEG富集分析结果提示, HIF-1α联合MSA处理组对宫颈癌细胞生长的抑制作用主要是通过诱导细胞凋亡来实现的, 引起细胞凋亡的机制可能是通过p53信号通路、凋亡通路以及作用于细胞信号转导途径等方式实现。同时与TNF信号通路、MAPK信号通路及下游基因的表达密切相关(图5A~C)。

3 讨论

有研究<sup>[10]</sup>表明, 因低氧导致的酸性微环境会激活多种信号通路和生存因子, 造成肿瘤对包括化疗在内的多种治疗方法的耐受和抵抗。前列腺癌患者的氧气张力降低会诱导产生HIF-1α, HIF-1α的上调激活癌基因并使肿瘤抑制基因失活, 有助于前列

腺癌细胞的存活并增加其转移潜能。因此, HIF-1α是前列腺肿瘤低氧适应性反应的主要调节因子, 这使得HIF-1α成为化学预防和化疗策略的可行靶点。另有研究<sup>[11]</sup>表明MSA作用于高度侵袭性的人前列腺癌细胞后, 可抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡, 且在低氧条件下比常氧条件下作用效果更强, 其机制是通过抑制缺氧诱导因子HIF-1α及其下游靶标实现的, 这提示在侵袭性前列腺癌治疗中使用MSA靶向HIF-1α的可能性。研究<sup>[12]</sup>表明, 卵巢癌细胞中MSA通过PDL1和VEGF抑制增强T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。

HIF-1α是一个氧依赖转录因子, 广泛存在于哺乳动物中, 通过调控低氧相关基因的表达进而促进癌细胞增殖和血管生成。肿瘤组织普遍处于低氧环境, HIF-1α作为适应肿瘤细胞低氧环境的激发因子, 在肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移等方面发挥重要作用, 尤其与妇科肿瘤的发生发展密切相关。宫颈癌是全世界最常见的妇科恶性肿瘤之一, 早期诊断和筛查结果表明, 引起宫颈癌的主要原因是人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染, 当HPV病毒亚型在低氧条件下出现时, HIF-1α蛋白表达量增加, 提示HPV病毒可通过调节细胞低氧相关因子的表达影响宫颈癌的进展<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>表明, HIF-1α与VEGF在宫颈癌组织中的表达呈正相关, HIF-1可能通过上调VEGF的表达而激活某些低氧代谢通路, 使宫颈癌细胞适应低氧环境而促进癌症的发生。抑制HIF-1α表达可通过减少VEGF及增加p53来增强宫颈癌细胞的放射敏感性<sup>[14]</sup>。因此, 通过改变肿瘤的低氧微环境进而降低肿瘤发生发展过程中各方面的促进作用, 对宫颈癌的治疗具有积极意义。

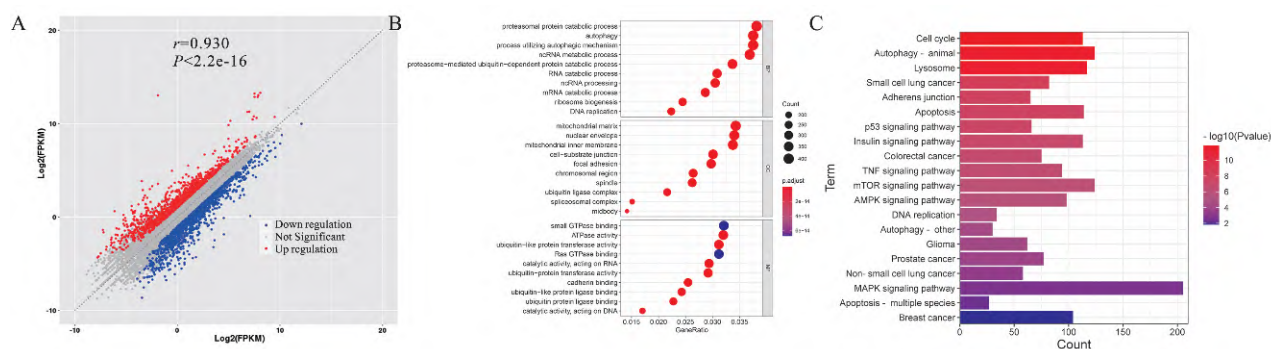


图5 RNA-seq检测HIF-1α联合MSA细胞的转录本和信号通路变化

A: 差异表达基因火山图分析; B: 差异表达基因GO功能注释分析; C: 差异表达基因KEEG富集分析

该研究以中国常见肿瘤宫颈癌为主要研究对象,围绕甲基硒酸联合 HIF-1 $\alpha$  沉默对宫颈癌细胞增殖、凋亡、侵袭迁移的影响,结合转录组学分析,探讨 HIF-1 $\alpha$  沉默联合甲基硒酸药物对宫颈癌细胞增殖和凋亡的作用机制,实验数据表明,与对照组相比,干扰 HIF-1 $\alpha$  联合 MSA 能够抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡;同时细胞迁移和蛋白表达检测结果表明,干扰 HIF-1 $\alpha$  联合 MSA 能够抑制 HeLa 细胞迁移,并且下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 E-cadherin 蛋白表达,其调控机制可能与 Bcl-2 家族蛋白表达和 p53 信号通路抑制相关。以上研究提示 MSA 联合 HIF-1 $\alpha$  基因沉默可能作为宫颈癌治疗新的靶点。

### 参考文献

- [1] Radomska D, Czarnomysy R, Radomski D, et al. Selenium compounds as novel potential anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22( 3): 1009.
- [2] Lippman S M, Klein E A, Goodman P J, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the selenium and vitamin E cancer prevention trial ( SELECT) [J]. *JAMA*, 2009, 301( 1): 39–51.
- [3] Varlamova E G, Turovsky E A. The main cytotoxic effects of methylseleninic acid on various cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22( 12): 6614.
- [4] Míriam T C, Roldán C, Miriam Z. Methylseleninic acid promotes antitumour effects *via* nuclear FOXO3a translocation through Akt inhibition [J]. *Pharmacol Res* 2015, 102: 218–34.
- [5] 邱万寿,唐勇,刘威等. 甲基硒酸对人三阴性乳腺癌细胞化疗增敏作用的机制探讨[J]. *中国病理生理杂志* 2013, 29( 11): 1990–3.
- [6] Shireen K, Simone J, Li J, et al. Methylseleninic acid antagonizes the cytotoxic effect of bortezomib in mantle cell lymphoma cell lines through modulation of Bcl-2 family proteins [J]. *Br J Haematol*, 2012, 156( 2): 286–9.
- [7] Hu W L, Ma Y R, Zhao C, et al. Methylseleninic acid overcomes programmed death-ligand 1-mediated resistance of prostate cancer and lung cancer [J]. *Mol Carcinog* 2021, 60( 11): 746–57.
- [8] Yan L, Nielsen F H, Sundaram S, et al. Dietary selenium supplementation does not attenuate mammary tumorigenesis-mediated bone loss in male MMTV-PyMT mice [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 194( 1): 221–7.
- [9] 刘敏,刘学武,李子军,等. 宫颈癌组织中 PD-1、HIF-1 $\alpha$ 、TAM 表达变化及相关性研究 [J]. *全科医学临床与教育*, 2020, 18( 12): 1068–71.
- [10] Zhang Y X, Cheng Y D, Zhang Z X, et al. CDCA2 inhibits apoptosis and promotes cell proliferation in prostate cancer and is directly regulated by HIF-1 $\alpha$  pathway [J]. *Front Oncol* 2020, 10: 725.
- [11] Sinha I, Null K, Wolter W, et al. Methylseleninic acid downregulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in invasive prostate cancer [J]. *Int J Cancer* 2012, 130( 6): 1430–9.
- [12] Nair D, Rådestad E, Khalkar P, et al. Methylseleninic acid sensitizes ovarian cancer cells to T-cell mediated killing by decreasing PDL1 and VEGF levels [J]. *Front Oncol* 2018, 8: 407.
- [13] 黄玲玲,周懿雯,平毅. 低氧诱导因子-1 在妇科恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学* 2021, 29( 15): 2745–8.
- [14] Li N, Meng D D, Gao L, et al. Overexpression of HOTAIR leads to radioresistance of human cervical cancer *via* promoting HIF-1 $\alpha$  expression [J]. *Radiat Oncol* 2018, 13( 1): 210.

## Study on effect and mechanism of HIF-1 $\alpha$ silencing combined with methylseleninic acid on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells

Li Zhenhao<sup>1</sup>, Hou Yaofeng<sup>1</sup>, Li Ling<sup>1</sup>, Huang Xuanyu<sup>1</sup>, Liu Wanyu<sup>1</sup>, Zhang Aixia<sup>2</sup>, Wang Nan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015; <sup>2</sup>Agro-biological

Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

**Abstract Objective** To investigate the influence and molecular mechanism of hypoxia-inducing factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) gene silencing combined with methyl selenenic acid (MSA) on cervical cancer cell proliferation, apoptosis and cell migration. **Methods** HeLa cells were transfected with HIF-1 interference RNA and negative control RNA. After transfection for 48 h, cells were stimulated with MSA for 24 h, and cell proliferation was determined by CCK-8 assay and colony formation. Apoptosis was determined by flow cytometry combined with Annexin V-FITC/PI. The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, and E-cadherin were detected by Western blot assay. Cell migration ability was determined by Transwell assay. RNA-seq analysis was used to investigate the differentially expressed genes and differential signaling pathways. **Results** Compared with the control group, interfering with HIF-1 $\alpha$  combined with MSA significantly inhibited cell proliferation ( $P < 0.01$ ). Flow cytometry results showed that the combined drug group significantly induced apoptosis. Transwell results showed that interfering with HIF-1 $\alpha$  combined with MSA

网络出版时间: 2022-11-28 18:21 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1717.019.html>

## H<sub>2</sub>S 通过调节铁死亡中 Xc<sup>-</sup>/GPX4 通路减轻脓毒症心肌损伤

曹国栋<sup>1</sup>, 邓飞飞<sup>2</sup>, 赵宇含<sup>1</sup>, 曾佑成<sup>1</sup>, 林 靓<sup>1</sup>, 郭立春<sup>1</sup>, 罗茜晴<sup>1</sup>, 张芝馨<sup>1</sup>, 黄 铭<sup>1</sup>, 程青虹<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨硫化氢供体 NaHS 能否通过抑制氧化应激 激活铁死亡中 Xc<sup>-</sup>/GPX4 信号通路改善脓毒症心肌损伤。方法 脂多糖(LPS)诱导大鼠心肌细胞 H9c2 形成脓毒症心肌损伤体外模型,分为 Control 组、LPS 组、LPS + NaHS 组。采用试剂盒检测心肌细胞活力、Fe<sup>2+</sup>、LDH、CK-MB 变化,测定氧化应激指标 GSH、MDA 水平,荧光探针检测细胞 ROS、线粒体膜电位水平变化,Western blot 检测铁死亡调控蛋白 SLC7A11、GPX4 表达水平。结果 与 Control 组相比,LPS 刺激后 H9c2 细胞活力下降,Fe<sup>2+</sup> 浓度升高,GSH、MDA、ROS 水平升高,线粒体 JC-1 单体增多,铁死亡调控蛋白 SLC7A11、GPX4 的表达水平下降,细胞损伤增加( $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比,NaHS 可减轻 LPS 诱导的 H9c2 细胞损伤和 Fe<sup>2+</sup> 浓度升高,降低 LPS 诱导的 H9c2 细胞氧化应激的水平,增加了铁死亡调控蛋白 SLC7A11、GPX4 的表达水平( $P < 0.05$ )。结论 硫化氢供体 NaHS 减轻脓毒症心肌损伤的机制可能与抑制氧化应激,激活铁死亡中 Xc<sup>-</sup>/GPX4 信号通路有关。

**关键词** 脓毒症心肌损伤; H<sub>2</sub>S; 铁死亡; 氧化应激  
中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1959-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.019

脓毒症是一个重要的健康问题,是重症监护病房患者死亡的主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。脓毒症所致的心肌损伤是脓毒症患者的常见并发症,其复杂发病

机制包括炎症介质失调、氧化应激、内质网应激、自噬等<sup>[3]</sup>。铁死亡是一种新型依赖活性氧(reactive oxygen species,ROS)和铁的调节性细胞死亡形式,研究<sup>[4]</sup>表明其在脓毒症引起的心肌损伤中起重要作用。硫化氢(hydrogen sulfide,H<sub>2</sub>S)是新型气体信号分子,NaHS 作为外源性的硫化氢供体,具有抗炎、抗氧化应激、抗凋亡、调节自噬等作用,通过调节多重信号通路以减轻脓毒症多器官损伤,已成为脓毒症治疗研究的新靶向<sup>[5-7]</sup>。尽管 NaHS 在脓毒症防治中已经被广泛研究,但是否通过调节铁死亡发挥作用尚未见报道。该研究采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激 H9c2 大鼠心肌细胞的方法建立了脓毒症心肌损伤细胞模型,探讨硫化氢供体 NaHS 能否通过抑制氧化应激,激活铁死亡中 Xc<sup>-</sup>/GPX4 信号通路改善脓毒症心肌损伤。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** H9c2 大鼠心肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自以色列 BI 公司;LPS、NaHS 均购自美国 Sigma 公司;CCK-8 细胞活力检测试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司;铁离子比色法检测试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isomer-MB,CK-MB)试剂盒、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)测定试剂盒、细胞丙二醛(malondialdehyde,MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;ROS、JC-1 荧光探针均购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗 GPX4 和 SLC7A11 抗体购自上海 Abmart 医药科技

2022-08-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860336)

作者单位:<sup>1</sup>石河子大学医学院第一附属医院重症二科,石河子 832000

<sup>2</sup>石河子大学药学院,石河子 832000

作者简介:曹国栋,男,硕士研究生;

程青虹,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xunfeicheng2015@163.com

inhibited HeLa cell migration. Compared with the control group, interfering with HIF-1 $\alpha$  combined with MSA down-regulated the expression of Bcl-2 and up-regulated the expression of E-cadherin. RNA-sequencing combined with signal pathway enrichment results showed that the expression of apoptotic signal pathway and downstream genes was inhibited. **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  gene silencing combined with MSA can synergistically inhibit the proliferation and induce apoptosis of cervical cancer cells, and its regulatory mechanism may be related to the expression of Bcl-2 family proteins and the inhibition of p53 signaling pathway.

**Key words** hypoxia inducer factor-1 $\alpha$ ; methylselenenic acid; cervical cancer; cell proliferation; apoptosis