

# 缺氧诱导 $\beta$ -catenin 乳酸化修饰对心肌细胞损伤影响及作用机制的实验研究

朱新华, 张晓阳, 张 蕾, 张玉婷(新疆医科大学第五附属医院老年病科, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 探究缺氧环境下  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)乳酸化修饰对心肌细胞损伤的影响及其作用机制。**方法** 将大鼠胚胎心肌细胞 H9c2 进行常氧和缺氧培养, 分为对照组、缺氧组、缺氧+2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)组、缺氧+乳酸(LA)组。CCK-8 法和 EdU 染色检测各组 H9c2 细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 比色法检测各组 H9c2 细胞亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )含量、乳酸脱氢酶(LDH)释放量、丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量, DCFH-DA 探针染色法检测细胞活性氧(ROS)水平, Western blot 和免疫共沉淀检测细胞中  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平以及 Wnt1、 $\beta$ -catenin、糖原合成酶激酶-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 缺氧组 H9c2 细胞中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3  $\beta$  蛋白表达水平上调, 乳酸含量升高, 整体蛋白乳酸化修饰水平及  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平均升高, 差异具有统计学意义( $t=20.653\sim41.525$ , 均  $P<0.05$ ); 缺氧组 H9c2 细胞活力和 EdU 阳性细胞率以及 GSH 含量降低, 凋亡率增加,  $\text{Fe}^{2+}$  含量、LDH 释放量、ROS 水平及 MDA 含量均升高, 差异具有统计学意义( $t=22.447\sim36.925$ , 均  $P<0.05$ ); 缺氧+2-DG 组细胞活力和 EdU 阳性细胞率升高, 凋亡率减少,  $\text{Fe}^{2+}$  含量、LDH 释放量、ROS 水平及 MDA 含量均降低, GSH 含量则升高, 细胞中整体蛋白乳酸化修饰水平及  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平降低, Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3  $\beta$  蛋白表达水平下调, 差异具有统计学意义( $t=14.608\sim39.285$ , 均  $P<0.05$ )。而相较于缺氧组, 缺氧+LA 组细胞活力和 EdU 阳性细胞率降低, 凋亡率增加,  $\text{Fe}^{2+}$  含量、LDH 释放量、ROS 水平及 MDA 含量均升高, GSH 含量降低, 细胞中整体蛋白乳酸化修饰水平及  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平升高, Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3  $\beta$  蛋白表达水平上调, 差异具有统计学意义( $t=12.115\sim37.664$ , 均  $P<0.05$ )。**结论** 缺氧环境下的 H9c2 细胞中  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平升高, 通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进细胞氧化应激和铁死亡, 加重细胞损伤。

**关键词:** 心肌细胞; 缺氧; 乳酸化修饰; 铁死亡; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

**中图分类号:** R542.2; R-332; R446.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)05-105-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.05.018

## Experimental Study on the Effects and Mechanisms of Hypoxia-Induced $\beta$ -Catenin Lactylation on Cardiomyocyte Injury

ZHU Xinhua, ZHANG Xiaoyang, ZHANG Lei, ZHANG Yuting (Department of Geriatrics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effects and mechanisms of  $\beta$ -catenin lactylation on cardiomyocyte injury under hypoxic conditions. **Methods** Rat embryonic cardiomyocytes H9c2 were cultured under normoxic or hypoxic conditions and divided into four groups: control, hypoxia, hypoxia + 2-deoxy-D-glucose (2-DG), hypoxia + lactate (LA). CCK-8 assay and EdU staining were used to detect the proliferation ability of H9c2 cells in each group. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Colorimetric assays were used to detect ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) content, lactate dehydrogenase (LDH) release, malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH) content. DCFH-DA probe staining was used to detect the reactive oxygen species (ROS) levels. Western blot and co-immunoprecipitation were used to detect the lactylation level of  $\beta$ -catenin and the protein expression levels of Wnt1,  $\beta$ -catenin and GSK-3  $\beta$ . **Results** Compared with the control group, the hypoxia group showed significantly upregulated protein levels of Wnt1,  $\beta$ -catenin and GSK-3  $\beta$ , increased lactate content, and elevated overall protein lactylation level and the  $\beta$ -catenin specific lactylation ( $t=20.653\sim41.525$ , all  $P<0.05$ ). Additionally, the hypoxia group exhibited decreased cell viability and EdU-positive cell rate, increased apoptosis rate, elevated  $\text{Fe}^{2+}$  content, LDH release, ROS levels and MDA content, and reduced GSH content ( $t=22.447\sim36.925$ , all  $P<0.05$ ). Compared with the hypoxia group, the hypoxia + 2-DG group showed increased cell viability and EdU-positive cell rate, decreased apoptosis,  $\text{Fe}^{2+}$  content, LDH, ROS and MDA levels, elevated GSH content, as well as decreased global and  $\beta$ -catenin-specific lactylation and downregulated Wnt1,  $\beta$ -catenin, and GSK-3  $\beta$  proteins ( $t=14.608\sim39.285$ , all  $P<0.05$ ). In contrast, compared with the hypoxia group, the hypoxia + LA group exhibited further decreased cell viability and EdU-positive cell rate, increased apoptosis, elevated  $\text{Fe}^{2+}$ , LDH, ROS, and MDA levels, reduced GSH

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2023D01C152)。

**作者简介:** 朱新华(1979-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 老年心血管疾病基础与临床研究, E-mail: zhuxinhua8@hotmail.com。

content, further increased global and  $\beta$ -catenin-specific lactylation, and further upregulated Wnt1,  $\beta$ -catenin, and GSK-3 $\beta$  protein levels ( $t=12.115\sim37.664$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusions** Hypoxia elevates  $\beta$ -catenin lactylation in H9c2 cells, which promotes oxidative stress and ferroptosis and aggravates cell injury through modulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Keywords:** cardiomyocytes; hypoxia; lactylation; ferroptosis; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

心肌缺氧是由于氧供不足或代谢紊乱引起的心肌功能障碍, 常见于冠状动脉疾病、心肌梗死、心力衰竭以及围手术缺血再灌注等病理状态, 是导致心血管患者死亡的重要原因之一<sup>[1-3]</sup>。在缺氧环境下, 心肌细胞能量代谢由氧化磷酸化转变为糖酵解, 伴随乳酸的大量产生与积聚, 进而诱发氧化应激和细胞死亡, 成为心脏损伤及功能障碍的关键环节<sup>[4-5]</sup>。近年来研究发现, 乳酸不仅是糖酵解的代谢产物, 还可作为信号分子介导蛋白质乳酸化修饰, 通过表观遗传调控影响细胞存活、炎症反应、能量代谢和免疫功能等<sup>[6-8]</sup>, 提示乳酸化修饰在心血管疾病中具有重要作用。但其在缺氧诱导的心肌损伤中的具体作用机制和关键靶点仍未明确。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路作为经典的发育与稳态调控通路, 在缺氧诱导的心肌损伤中异常激活, 会加剧氧化应激和细胞凋亡, 扩大心肌梗死面积, 从而导致心功能进一步恶化<sup>[9-10]</sup>。值得注意的是,  $\beta$ -catenin的稳定性与功能受多种翻译后修饰调控, 而乳酸化修饰可能是其中的重要环节。有研究提示, 缺氧条件下乳酸化修饰可能参与调节 $\beta$ -catenin的表达和活性<sup>[11]</sup>, 但该机制在心肌缺氧损伤中的作用尚未见报道。基于此, 本研究旨在探讨心肌细胞缺氧状态下 $\beta$ -catenin乳酸化修饰的变化, 以及其对心肌缺氧损伤影响与作用机制, 并为缺血性心脏病治疗提供新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

1.1 细胞来源 大鼠胚胎心肌细胞H9c2购自南京万木春生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 DMEM培养基(货号: C11995500 BT, 北京百奥创新科技有限公司), BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号: P0012)、ECL试剂盒(货号: P0018)、蛋白A/G琼脂糖磁珠(货号: P2055)(上海碧云天生物科技有限公司), CCK-8试剂盒(货号: C6005, 上海弗元生物科技有限公司), EdU试剂盒(货号: C0071S, 广州市锐博生物科技有限公司), Annexin V-FITC/PI试剂盒(货号: FXP018)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(货号: A020-2-2)(北京伊塔生物科技有限公司), 丙二醛(MDA)试剂盒(货号: A003-1)、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(货号: A006-2)(南京建成生物工程研究所), 活性氧(ROS)DCFH-DA荧光探针(货号: S0033S, 北京兰博利德商贸有限公司), Wnt1抗体(货号: ab15251)、 $\beta$ -catenin抗体(货号: ab32572)、GSK-3 $\beta$ 抗体(货号: ab32391)、HRP标记的二抗(货号: ab6721)(Abcam公司), GAPDH抗体(货号: MA5-15738)、 $\beta$ -actin抗体(货

号: MA5-11869)(美国Invitrogen公司), 赖氨酸乳酸化修饰(Pan-Kla)抗体(货号: A23610, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)。CKX53倒置显微镜(日本Olympus公司), H1850台式高速冷冻离心机(湘仪仪器有限公司), DYY-6C电泳仪及DYCZ-40D转膜系统(北京六一仪器厂), SP-Max 2300A酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司), DMi8荧光显微镜(德国Leica公司), FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 心肌细胞正常培养与缺氧处理: H9c2细胞在含10g/dl胎牛血清、1%(w/v)青霉素和链霉素的DMEM培养基中, 置于37℃、5%(v/v)CO<sub>2</sub>条件下常规培养。在模拟缺氧损伤时, 将H9c2细胞置于37℃、94%(v/v)N<sub>2</sub>、5%(v/v)CO<sub>2</sub>和1%(v/v)O<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h。

1.3.2 细胞分组与处理: 将H9c2细胞分为4组进行不同处理, 具体如下: ①对照组, H9c2细胞在常规条件下培养; ②缺氧组, H9c2细胞在缺氧条件下培养; ③缺氧+2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)组, H9c2细胞在缺氧条件下培养, 同时在培养液中添加5 mmol/L 2-DG以抑制糖酵解; ④缺氧+乳酸(LA)组, H9c2细胞在缺氧条件下培养, 同时在培养液中添加20 mmol/L LA以促进细胞外LA负荷。各组细胞持续培养24 h, 结束后收集细胞进行后续实验分析。

1.3.3 Western blot检测 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 蛋白表达: 收集不同处理后的H9c2细胞, 使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液进行裂解, 12 000 r/min离心10 min, 获取上清液, BCA法测定样品浓度。将等量蛋白样品加载于SDS-PAGE凝胶孔中进行电泳分离, 将分离的蛋白转移至PVDF膜上, 使用5g/dl脱脂奶粉溶液在室温下封闭膜1h后, 于4℃与特异性一抗共孵育过夜。次日洗膜后, 于室温下与HRP偶联的二抗共孵育1h。使用增强型ECL试剂显影, 检测目标蛋白条带, ImageJ软件对蛋白信号进行灰度值分析。

1.3.4 免疫共沉淀结合Western blot检测 $\beta$ -catenin乳酸化修饰水平: 收集不同处理后的H9c2细胞, PBS清洗后, 加入含蛋白酶抑制剂的IP裂解液裂解细胞, 12 000 r/min离心10 min, 获取上清液, 取一部分全细胞裂解液检测整体乳酸化修饰水平; 在另一部分中加入抗 $\beta$ -catenin抗体, 混匀后置于4℃孵育过夜, 加入蛋白A/G琼脂糖磁珠, 4℃孵育4h, 4 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 用IP裂解液洗涤磁珠, 加入SDS-PAGE上样缓冲液, 与全细胞裂解液均通过100℃煮

沸5 min变性后,进行后续 Western blot实验检测。

1.3.5 比色法测定乳酸含量:取正常和缺氧培养后的H9c2细胞,PBS清洗后,加入150  $\mu$ l乳酸测定缓冲液混匀,12 000 r/min离心5 min后收集上清液,采用比色法测定乳酸含量,严格根据试剂盒说明书操作。

1.3.6 CCK-8实验检测细胞活力:将H9c2细胞以每孔 $5 \times 10^4$ 个细胞接种于96孔板中,按1.3.2分组处理24h,每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂,37℃孵育2h,实验设空白孔和未处理对照孔,使用酶标仪于450nm波长测定各孔吸光度(A)值。

1.3.7 EdU染色检测细胞增殖:将处理后的H9c2细胞接种于24孔板中,加入10  $\mu$ mol/L EdU工作液,在37℃下孵育2 h。固定细胞后,依次进行Apollo染色反应和DAPI核染,结束后洗涤、封片,使用荧光显微镜观察并拍摄细胞染色图像,统计并计算EdU阳性细胞比例(%)=EdU阳性细胞数目/总细胞数目 $\times 100\%$ 。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡:将处理后的H9c2细胞用胰酶消化、收集并用PBS洗涤后,重悬于结合缓冲液中,加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC和5  $\mu$ l碘化丙啶,室温避光孵育15 min,使用流式细胞仪进行检测,分析早期和晚期凋亡细胞比例。

1.3.9 细胞中 $\text{Fe}^{2+}$ 、LDH、ROS、MDA及GSH水平检测:收集处理后的H9c2细胞和细胞培养上清液, $\text{Fe}^{2+}$ 、LDH、ROS、MDA及GSH水平分别使用相应试剂盒进行检测,操作均严格按照各试剂盒说明书进行。 $\text{Fe}^{2+}$ 含量、LDH释放量、MDA和GSH含量均采用比色法检测,ROS水平使用DCFH-DA探针染色法检测。

1.4 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行数据统计处理。各计量数据符合正态分布且方差齐性,以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 缺氧处理对H9c2细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路及 $\beta$ -catenin乳酸化水平的影响 见表1。与对照组比较,缺氧组H9c2细胞中Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 蛋白表达水平显著上调,说明Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路被激活;缺氧组H9c2细胞中乳酸含量显著升高,差异具有统计学意义;缺氧组H9c2细胞中整体蛋白乳酸化修饰水平较对照组升高,同时, $\beta$ -catenin乳酸化修饰水平也显著高于对照组,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

表1 缺氧处理对H9c2细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白表达及乳酸化水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 项目                      | 对照组             | 缺氧组             | $t$    | $P$       |
|-------------------------|-----------------|-----------------|--------|-----------|
| Wnt1                    | $0.08 \pm 0.01$ | $0.44 \pm 0.05$ | 23.471 | $< 0.001$ |
| $\beta$ -catenin        | $0.07 \pm 0.01$ | $0.46 \pm 0.06$ | 20.653 | $< 0.001$ |
| GSK-3 $\beta$           | $0.10 \pm 0.01$ | $0.43 \pm 0.05$ | 31.924 | $< 0.001$ |
| 乳酸含量                    | $0.23 \pm 0.03$ | $0.57 \pm 0.06$ | 33.092 | $< 0.05$  |
| $\beta$ -catenin乳酸化修饰水平 | $0.43 \pm 0.04$ | $1.01 \pm 0.11$ | 41.525 | $< 0.05$  |

2.2  $\beta$ -catenin乳酸化对缺氧诱导下H9c2细胞增殖与凋亡的影响 见表2。与对照组比较,缺氧组H9c2细胞活力和EdU阳性细胞率显著降低,差异具有统计学意义( $t=23.417$ 、 $35.892$ ,均 $P < 0.05$ );与缺氧组比较,缺氧+2-DG组细胞活力和EdU阳性细胞率显著升高,差异具有统计学意义( $t=27.104$ 、 $39.285$ ,均 $P < 0.05$ ),缺氧+LA组细胞活力和EdU阳性细胞率则

较缺氧组显著降低,差异具有统计学意义( $t=21.763$ 、 $30.446$ ,均 $P < 0.05$ )。与对照组比较,缺氧组H9c2细胞凋亡率显著增加( $t=26.971$ );与缺氧组比较,缺氧+2-DG组细胞凋亡率显著减少( $t=33.528$ ),而缺氧+LA组细胞凋亡率进一步增加( $t=37.664$ ),差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

表2  $\beta$ -catenin乳酸化对缺氧诱导下H9c2细胞活力、EdU阳性细胞率及细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 项目          | 对照组               | 缺氧组              | 缺氧+2-DG组         | 缺氧+LA组           | $F$     | $P$       |
|-------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------|-----------|
| 细胞活力(%)     | $100.00 \pm 9.96$ | $62.35 \pm 6.49$ | $87.09 \pm 8.67$ | $39.06 \pm 4.15$ | 213.046 | $< 0.001$ |
| EdU阳性细胞率(%) | $43.50 \pm 4.06$  | $24.81 \pm 2.52$ | $38.55 \pm 4.14$ | $14.68 \pm 1.58$ | 157.821 | $< 0.001$ |
| 细胞凋亡率(%)    | $3.97 \pm 0.41$   | $16.59 \pm 1.75$ | $8.98 \pm 0.92$  | $27.07 \pm 3.12$ | 133.589 | $< 0.001$ |

2.3  $\beta$ -catenin乳酸化对缺氧诱导下H9c2细胞铁死亡的影响 见表3。不同处理下H9c2细胞中 $\text{Fe}^{2+}$ 、LDH、ROS、MDA及GSH水平测定结果显示,与对照组比较,缺氧组 $\text{Fe}^{2+}$ 含量、LDH释放量、ROS水平及MDA含量均显著升高( $t=25.381$ 、 $31.764$ 、 $36.925$ 、

$22.447$ ),GSH含量显著降低( $t=28.193$ ),差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ );与缺氧组比较,缺氧+2-DG组 $\text{Fe}^{2+}$ 含量、LDH释放量、ROS水平及MDA含量均显著降低( $t=33.509$ 、 $39.128$ 、 $24.672$ 、 $27.856$ ),GSH含量则显著升高( $t=35.204$ ),而缺氧+LA组 $\text{Fe}^{2+}$ 含量、LDH释

放量、ROS水平及MDA含量均较缺氧组进一步升高( $t=23.674$ 、 $12.115$ 、 $28.927$ 、 $29.442$ ), GSH含量较缺氧组进一步降低( $t=21.587$ ), 差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。

表3  $\beta$ -catenin 乳酸化对缺氧诱导下 H9c2 细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ 、LDH、ROS、MDA 及 GSH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 项目                                    | 对照组              | 缺氧组                | 缺氧+2-DG组         | 缺氧+LA组             | <i>F</i> | <i>P</i>  |
|---------------------------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------|-----------|
| $\text{Fe}^{2+}$ (pg/ $\mu\text{g}$ ) | $7.45 \pm 0.75$  | $25.87 \pm 2.79$   | $14.76 \pm 1.57$ | $31.08 \pm 3.26$   | 137.654  | $< 0.001$ |
| LDH (U/L)                             | $48.90 \pm 5.04$ | $136.67 \pm 14.68$ | $86.05 \pm 8.93$ | $161.06 \pm 17.85$ | 312.759  | $< 0.001$ |
| ROS                                   | $7.45 \pm 0.75$  | $25.87 \pm 2.79$   | $14.76 \pm 1.57$ | $31.08 \pm 3.26$   | 176.935  | $< 0.001$ |
| MDA (nmol/mg)                         | $18.71 \pm 2.01$ | $48.63 \pm 5.21$   | $34.71 \pm 3.62$ | $62.45 \pm 6.50$   | 228.490  | $< 0.001$ |
| GSH ( $\mu\text{mol/g}$ )             | $17.56 \pm 1.85$ | $7.69 \pm 0.77$    | $11.25 \pm 1.29$ | $5.02 \pm 0.53$    | 189.274  | $< 0.001$ |

2.4 不同处理下 H9c2 细胞中  $\beta$ -catenin 乳酸化水平及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路变化 见表4。与缺氧组( $0.83 \pm 0.08$ )比较, 缺氧+2-DG组 H9c2 细胞中整体蛋白乳酸化修饰水平降低,  $\beta$ -catenin 乳酸化修饰水平( $0.47 \pm 0.05$ )显著减少, 差异具有统计学意义( $t=15.933$ ,  $P<0.05$ ), 而缺氧+LA组细胞整体蛋白乳酸化修饰水平明显高于缺氧组,  $\beta$ -catenin 乳酸化

修饰水平( $1.62 \pm 0.17$ )也显著增加, 差异具有统计学意义( $t=19.276$ ,  $P<0.05$ ); 缺氧+2-DG组 H9c2 细胞中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平较缺氧组显著下调( $t=18.713$ 、 $14.608$ 、 $15.927$ ), 而缺氧+LA组中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平则较缺氧组显著上调( $t=22.469$ 、 $17.580$ 、 $13.144$ ), 差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。

表4  $\beta$ -catenin 乳酸化对缺氧诱导下 H9c2 细胞中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 项目               | 对照组             | 缺氧组             | 缺氧+2-DG组        | 缺氧+LA组          | <i>F</i> | <i>P</i>  |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|-----------|
| Wnt1             | $0.27 \pm 0.03$ | $0.83 \pm 0.08$ | $0.25 \pm 0.03$ | $1.37 \pm 0.15$ | 72.305   | $< 0.001$ |
| $\beta$ -catenin | $0.12 \pm 0.01$ | $0.84 \pm 0.09$ | $0.09 \pm 0.01$ | $1.39 \pm 0.12$ | 57.098   | $< 0.001$ |
| GSK-3 $\beta$    | $0.10 \pm 0.01$ | $0.69 \pm 0.07$ | $0.10 \pm 0.01$ | $1.20 \pm 0.13$ | 88.762   | $< 0.001$ |

3 讨论

心肌持续缺氧可导致收缩功能下降、心律失常及血管内皮功能障碍, 严重时甚至可能发展为致命性的心肌损伤。目前, 临床上主要通过改善供氧、减轻氧化应激、抑制细胞凋亡及炎症反应来缓解缺氧引起的损伤, 常用手段包括扩血管药物、 $\beta$ 受体阻滞剂及抗氧化剂, 部分研究还探索了对缺血再灌注损伤过程的干预<sup>[12-13]</sup>。然而, 这些策略通常难以从根本上阻断心肌细胞死亡的级联反应, 并可能伴随一定副作用。因此, 深入解析缺氧条件下心肌细胞损伤的分子机制, 对于寻找潜在的治疗靶点具有重要意义。

本研究显示, 缺氧处理后 H9c2 细胞增殖能力下降, 凋亡细胞比例升高, 并伴随 LDH 释放量增加, 提示低氧可诱导心肌细胞损伤并激活程序性死亡。LDH 释放量是评估细胞膜完整性损伤的重要指标, 当细胞膜受损时, 胞内 LDH 释放至胞外, 其水平的升高可反映缺血缺氧所致心肌细胞损伤程度<sup>[14]</sup>。铁死亡强调铁离子依赖的脂质过氧化在非凋亡性细胞死亡形式中的核心作用, 其典型特征是细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  异常积累。  $\text{Fe}^{2+}$  可通过 Fenton 反应产生大量 ROS, 进而诱导脂质过氧化及细胞膜破坏<sup>[15]</sup>。在缺氧条件下, ROS 的过量积聚被认为是心肌细胞损伤和功能障碍的重要介导因素, 其可促使细胞膜中多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 破坏膜结构完整性并

生成脂质过氧化物<sup>[16]</sup>。MDA 作为脂质过氧化的终产物, 可反映膜脂质受损的程度; GSH 是细胞内主要的抗氧化剂, 其含量下降则提示抗氧化防御能力受损<sup>[17-18]</sup>。上述生化指标的变化共同支持缺氧条件下心肌细胞发生以铁稳态失衡和脂质过氧化为特征的病理过程。在本研究中, 缺氧处理的 H9c2 细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量、ROS 水平和 MDA 含量均升高, 而 GSH 含量降低, 提示 H9c2 细胞在缺氧环境下发生铁死亡, 并伴随氧化还原稳态失衡。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路异常激活与多种疾病的发生和进展密切相关。研究表明, 缺氧环境下该信号通路的适度激活有助于心肌细胞存活及血管新生, 从而支持组织修复<sup>[19-20]</sup>。然而, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的持续活化可能干扰细胞的正常分化程序, 促进细胞外基质沉积并加剧慢性炎症<sup>[21]</sup>。在心肌损伤小鼠和心肌细胞炎症模型中均检测到该信号通路的异常激活, 而抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路可减轻心肌细胞损伤和凋亡, 改善心肌纤维化<sup>[22-23]</sup>。GSK-3 $\beta$  是 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路下游的关键分子, 可促进  $\beta$ -catenin 降解, 从而抑制该通路活性。本研究结果显示, 缺氧条件下培养的 H9c2 细胞中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平均明显上调, 提示该通路在缺氧损伤中被激活, 并可能在心肌细胞应激反应中发挥调控作用。

乳酸化是一种由代谢重编程驱动的翻译后修

饰,可作用于组蛋白与非组蛋白,通过调控下游靶基因转录发挥生物学功能。缺氧环境下细胞糖酵解增强,导致乳酸大量积累并诱导组蛋白乳酸化<sup>[24-25]</sup>。既往研究表明,缺氧促进的糖酵解可增强 $\beta$ -catenin乳酸化水平,提高其稳定性和表达水平,进而通过Wnt信号通路促进结直肠癌细胞增殖及干性维持<sup>[11]</sup>。本研究同样发现,缺氧处理后H9c2细胞中LA含量增加,整体蛋白乳酸化及 $\beta$ -catenin乳酸化修饰水平均增加,提示缺氧通过乳酸积累促进 $\beta$ -catenin乳酸化修饰。为进一步探讨 $\beta$ -catenin乳酸化对心肌缺氧损伤的作用,本研究采用2-DG抑制糖酵解或外源补充LA以增加细胞LA负荷,检测结果显示,在缺氧条件下,2-DG可降低 $\beta$ -catenin乳酸化水平及抑制Wnt通路激活,同时提高细胞增殖活性,减少细胞凋亡并抑制铁死亡;而外源性补充LA则增强乳酸化修饰与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路活性,加重心肌细胞损伤。上述结果提示,乳酸化修饰可能通过调控 $\beta$ -catenin表达与功能,影响缺氧条件下H9c2细胞损伤。

综上所述,本研究表明,缺氧条件下心肌细胞中 $\beta$ -catenin乳酸化修饰增加,导致Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路异常激活,促进氧化应激和铁死亡,加剧心肌细胞损伤。这提示 $\beta$ -catenin乳酸化在缺氧诱导的心肌细胞损伤中具有促伤作用,为以乳酸化修饰为靶点的干预策略提供了新的实验依据。然而,本研究仍存在局限性,例如仅在H9c2细胞系中进行了体外研究,缺乏缺血/再灌注或心肌梗动物模型验证,且 $\beta$ -catenin具体乳酸化位点及功能尚未明确。未来将通过质谱与突变分析鉴定关键位点,并在动物模型中验证机制,进一步探索乳酸化干预的药理潜力,为精准治疗策略的开发奠定实验基础。

#### 参考文献:

- [1] GUO Z J, TIAN Y J, LIU N Y, et al. Mitochondrial stress as a central player in the pathogenesis of hypoxia-related myocardial dysfunction: new insights[J]. International Journal of Medical Sciences, 2024, 21(13): 2502-2509.
- [2] CHIARI P, FELLAHI J L. Myocardial protection in cardiac surgery: a comprehensive review of current therapies and future cardioprotective strategies[J]. Front Med, 2024, 11:1424188.
- [3] EL M A, WAHLEN B M. Cardiac arrest, stony heart, and cardiopulmonary resuscitation: an updated revisit[J]. World Journal of Cardiology, 2024, 16(3): 126-136.
- [4] MAO Y Z, ZHANG J J, ZHOU Q, et al. Hypoxia induces mitochondrial protein lactylation to limit oxidative phosphorylation[J]. Cell Research, 2024, 34(1): 13-30.
- [5] HU Y, HE Z L, LI Z J, et al. Lactylation: the novel histone modification influence on gene expression, protein function, and disease[J]. Clinical Epigenetics, 2024, 16(1): 72.
- [6] ZHAO S S, LIU J L, WU Q C, et al. Lactate regulates pathological cardiac hypertrophy via histone lactylation modification[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2024, 28(16): e70022.
- [7] JING F Y, ZHANG J Y, ZHANG H Y, et al. Unlocking the multifaceted molecular functions and diverse disease implications of lactylation[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2025, 100(1): 172-189.
- [8] LLIBRE A, KUCUK S, GOPE A, et al. Lactate: a key regulator of the immune response[J]. Immunity, 2025, 58(3): 535-554.
- [9] WANG Q, MA E, WO D, et al. Huoxin pill prevents acute myocardial ischaemia injury via inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(24): 11053-11062.
- [10] CHI X S, SHAN L, HU Y, et al. Bromodomain-containing protein 7 contributes to myocardial infarction-induced myocardial injury through activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Annals of Palliative Medicine, 2021, 10(10): 10756-10767.
- [11] MIAO Z, ZHAO X M, LIU X. Hypoxia induced  $\beta$ -catenin lactylation promotes the cell proliferation and stemness of colorectal cancer through the Wnt signaling pathway[J]. Experimental Cell Research, 2023, 422(1): 113439.
- [12] RIBEIRO E, COSTA B, VASQUES N F, et al. In vitro drug repurposing: focus on vasodilators[J]. Cells, 2023, 12(4): 671.
- [13] PAN J Y, ZHANG L, LI D X, et al. Hypoxia-inducible factor-1: regulatory mechanisms and drug therapy in myocardial infarction[J]. European Journal of Pharmacology, 2024, 963: 176277.
- [14] 雷汝, 曹勇, 朱明. USP22/KDM3A通路对七氟烷后处理缺血缺氧心肌细胞模型再灌注损伤保护机制的实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2025, 40(3): 31-36.
- [15] LEI R, CAO Y, ZHU M. Experimental study on the protective mechanism of USP22/KDM3A pathway against ischemia-reperfusion injury in sevoflurane postconditioning ischemic hypoxic cardiomyocyte model[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(3): 31-36.
- [16] GAO X, HU W, QIAN D L, et al. The mechanisms of ferroptosis under hypoxia[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2023, 43(7): 3329-3341.
- [17] ZHAO R Z, WANG X B, JIANG S, et al. Elevated ROS depress mitochondrial Oxygen utilization efficiency in cardiomyocytes during acute hypoxia[J]. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2020, 472(11): 1619-1630.
- [18] THIRUPATHI A, WANG M Z, LIN J K, et al. Effect of different exercise modalities on oxidative stress: a systematic review[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:1947928.
- [19] GASMI A, NASREEN A, LENCHYK L, et al. An update on glutathione's biosynthesis, metabolism, functions, and medicinal purposes[J]. Current Medicinal Chemistry, 2024, 31(29): 4579-4601.
- [20] ZHANG M, ZHANG Z L, HU J, et al. Knockdown of long noncoding RNA MIAT attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte injury by regulating the miR-488-3p/Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Cell Biology International, 2023, 47(1): 63-74.
- [21] LI L, LI C, CAO S, et al. Circ-SUZ12 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced dysfunction through upregulating SUZ12 expression to activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. International Heart Journal, 2023, 64(6): 1113-1124.

本研究仍存在不足之处:单中心回顾性设计,样本量相对有限,可能影响亚组分析的统计效能;其次,随访时间尚不够充分,延长随访周期将有助于进一步验证尿渗透压对远期预后的预测价值及其稳定性;最后,未联合检测其他肾小管标志物(如 $\alpha$ 1-MG、NAG)<sup>[15-16]</sup>,限制了对尿渗透压病理机制关联的深入解析。

综上所述,尿渗透压降低与IgA肾病患者的肾小管间质损伤程度及肾功能进展风险显著相关,可作为评估肾小管功能损害的非侵入性指标,并具备独立预后预测价值。建议在IgAN的临床管理中重视尿渗透压的监测,将其纳入综合风险评估体系,有助于实现更精准的分层干预与早期保护策略。

#### 参考文献:

- [1] STAMELLOU E, SEIKRIT C, TANG S C W, et al. IgA nephropathy[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2023, 9(1): 67.
- [2] PATRAPORNPIST P, AVILA-CASADO C, REICH H N. IgA nephropathy: core curriculum 2021 [J]. Core Curriculum, 2021, 78(3): 429-441.
- [3] FLOEGE J, BARRATT J, COOK H T, et al. Executive summary of the KDIGO 2025 clinical practice guideline for the management of Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) and Immunoglobulin A vasculitis (IgAV)[J]. Kidney International, 2025, 108(4): 548-554.
- [4] CHEUNG C K, ALEXANDER S, REICH H N, et al. The pathogenesis of IgA nephropathy and implications for treatment[J]. Nature Reviews Nephrology, 2025, 21(1): 9-23.
- [5] PLISCHKE M, KOHL M, BANKIR L, et al. Urine osmolality and risk of dialysis initiation in a chronic kidney disease cohort-a possible titration target?[J]. PLOS One, 2014, 9(3): e93226.
- [6] KONG T F, SHEN X H, SIM M Y, et al. Urine osmolality assessment through the integration of urea hydrolysis and impedance measurement[J]. Lab Chip, 2024, 24(15): 3728-3737.
- [7] TORRES V E, GRANTHAM J J, CHAPMAN A B, et al. Potentially modifiable factors affecting the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2011, 6(3): 640-647.
- [8] HEBERT L A, GREENE T, LEVEY A, et al. High urine volume and low urine osmolality are risk factors for faster progression of renal disease[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2003, 41(5): 962-971.
- [9] TABIBZADEH N, WAGNER S, METZGER M, et al. Fasting urinary osmolality, CKD progression, and mortality: a prospective observational study[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2019, 73(5): 596-604.
- [10] LEE M J, CHANG T I, LEE J, et al. Urine osmolality and renal outcome in patients with chronic kidney disease: results from the KNOW-CKD[J]. Kidney & Blood Pressure Research, 2019, 44(5): 1089-1100.
- [11] WANG X, ZHOU X J, QIAO X, et al. The evolving understanding of systemic mechanisms in organ-specific IgA nephropathy: a focus on gut-kidney crosstalk[J]. Theranostics, 2025, 15(2): 656-681.
- [12] BELLUR S S, TROYANOV S, VOROBYEVA O, et al. Evidence from the large VALIGA cohort validates the subclassification of focal segmental glomerulosclerosis in IgA nephropathy[J]. Kidney International, 2024, 105(6): 1279-1290.
- [13] AKIHISA T, KATAOKA H, MAKABE S, et al. Immediate drop of urine osmolality upon tolvaptan initiation predicts impact on renal prognosis in patients with ADPKD[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2024, 39(6): 1008-1015.
- [14] KITIWAN B K, VASUNILASHORN S M, BAER H J, et al. The association of urine osmolality with decreased kidney function and/or albuminuria in the United States[J]. BMC Nephrology, 2021, 22(1): 306.
- [15] LIU X, GONG S M, NING Y C, et al. Urinary N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase levels predict immunoglobulin a nephropathy remission status[J]. BMC Nephrology, 2023, 24(1): 208.
- [16] 傅园园, 罗厚龙, 张和君, 等. IgA肾病患者随机尿中ACR与24h UTP定量检测的相关性及其对临床诊断的一致性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2024, 39(6): 162-166.
- FU Y Y, LUO H L, ZHANG H J, et al. Correlation between random urinary ACR and 24 hour UTP quantification in patients with IgA nephropathy and consistency analysis of clinical diagnosis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2024, 39(6): 162-166.

收稿日期: 2025-09-03

修回日期: 2025-11-10

#### (上接第109页)

- [21] 秦伟卓, 费高强, 张学宁, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在疾病中的研究进展[J]. 现代医学, 2023, 51(9): 1337-1345.
- QIN W Z, FEI G Q, ZHANG X N, et al. Research progress of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in diseases[J]. Modern Medical Journal, 2023, 51(9): 1337-1345.
- [22] 胡君, 戴丽, 陈霞, 等. 神经肽Y/Y1受体激活 $\beta$ -catenin信号通路介导心肌细胞损伤[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2024, 44(3): 313-321.
- HU J, DAI L, CHEN X, et al. Neuropeptide Y/Y1 receptor activation mediates cardiomyocyte injury through  $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Journal of Nanjing Medical University: Natural Science Edition, 2024, 44(3): 313-321.
- [23] 刘熔, 崔彦杰, 宋金萍. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在

TNF- $\alpha$ 诱导的心肌细胞损伤和凋亡中的作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(8): 920-926.

- LIU R, CUI Y J, SONG J P. Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in TNF- $\alpha$ -induced cardiomyocyte injury and apoptosis[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2023, 44(8): 920-926.
- [24] KIERANS S J, TAYLOR C T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor(HIF): implications for cellular physiology[J]. Journal of Physiology, 2021, 599(1): 23-37.
- [25] LIAO Z, CHEN B, YANG T, et al. Lactylation modification in cardio-cerebral diseases: a state-of-the-art review[J]. Ageing Research Reviews, 2025, 104: 102631.

收稿日期: 2025-09-16

修回日期: 2025-11-18