DOI:10.16016/j.2097-0927.202312123

罗沙司他通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的肾小管上皮细胞凋亡与衰老

宋用为[1],王 玲[1],陈文婷[1],张明洋[1],杨学森[2],戴欢子[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心风湿免疫科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系热带医学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨罗沙司他对热打击诱导的肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)凋亡与衰老的影响及其机制。**方法** 体外培养 HK-2 细胞,用不同浓度(10、20、30、40、50 μmol/L)的罗沙司他处理 24 h,通过 CCK-8 法确定罗沙司他的最佳干预浓度。将 HK-2 细胞分为 4 组(n=3):对照组、罗沙司他组(30 μmol/L、24 h)、热打击组(43 ℃、2 h)、热打击+罗沙司他组(30 μmol/L 罗沙司他处理 24 h 后热打击 2 h)。通过 CCK-8 检测细胞活力;Western blot 检测缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1α)、Cleaved Caspase-3、p16、p21 蛋白表达量;免疫荧光检测 HIF-1α 分布;细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒检测 SA-β-Gal 活性;TUNEL 染色检测细胞凋亡情况。**结果** 用 30 μmol/L 罗沙司他处理的细胞活力最高。与对照组比较,热打击组细胞活力显著降低(P<0.05);HIF-1α、Cleaved Caspase-3、p16、p21 蛋白表达量显著增加(P<0.05);SA-β-Gal 活性显著增加(P<0.05);TUNEL 阳性细胞占比显著增加(P<0.05)。与热打击组比较,热打击+罗沙司他组 Cleaved Caspase-3、p16、p21 蛋白表达量显著降低(P<0.05);SA-β-Gal 活性显著降低[(65.44±5.00)% *vs* (77.15±2.61)%,P<0.05];TUNEL 阳性细胞占比显著降低[(16.73±2.20)% *vs* (46.40±13.87)%,P<0.05],细胞活力显著增加[(86.33±4.51)% *vs* (66.33±8.50)%,P<0.05];HIF-1α 蛋白表达量进一步增加(P<0.05)。免疫荧光结果显示 HIF-1α 主要分布在细胞核及细胞核周围。**结论** 罗沙司他通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的肾小管上皮细胞凋亡和衰老。

[关键词] 热打击;罗沙司他;HIF-1α;细胞凋亡;细胞衰老
[中图法分类号] R594.11; R692.9; R977.6 [文献标志码] A

Roxadustat attenuates heat stress-induced apoptosis and senescence in renal tubular epithelial cells by upregulating HIF-1α

SONG Yongwei[1], WANG Ling[1], CHEN Wenting[1], ZHANG Mingyang[1], YANG Xuesen[2], DAI Huanzi[1] [1]Department of Rheumatism Immunology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042; [2]Department of Tropical Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effect and underlying mechanism of roxadustat on apoptosis and senescence of renal tubular epithelial cell line HK-2 induced by heat stress. Methods After HK-2 cells were treated with different concentrations of roxadustat (10, 20, 30, 40 and 50 μmol/L) for 24 h, CCK-8 assay was used to determine the optimal intervention concentration of roxadustat. HK-2 cells were divided into 4 groups (n=3): control group, roxadustat group (30 μmol/L, 24 h), heat-stress group (43 ℃, 2 h), and heat-stress+roxadustat group (30 μmol/L roxadustat treatmnet for 24 h followed by heat-stress 2 h). Cell viability was detected by CCK-8 assay. Expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α), Cleaved Caspase-3, p16 and p21 at protein level was detected by Western blotting. Immunofluorescence assay was employed to observe the distribution of HIF-1α. β-galactosidase staining kit was utilized to detect SA-β-Gal

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX1101)
[通信作者] 戴欢子,E-mail:dhz084426@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

activity. TUNEL staining was used to measure cell apoptosis. **Results** The highest cell viability was observed in the cells after 30 μmol/L roxadustat treatment. Heat stress resulted in a significant decrease in cell viability ($P<0.05$), elevated protein levels of HIF-1α, Cleaved Caspase-3, p16 and p21 ($P<0.05$), enhanced SA-β-Gal activity ($P<0.05$) and increased percentage of TUNEL-positive cells ($P<0.05$) when compared with the cells in the control group. In comparison with the heat-stress group, the heat-stress + roxadustat group showed significant decrease in the protein levels of Cleaved Caspase-3, p16 and p21 ($P<0.05$), reduced activity of SA-β-Gal [(65.44±5.00)% *vs* (77.15±2.61)%, $P<0.05$] and decreased percentage of TUNEL-positive cells [(16.73±2.20)% *vs* (46.40±13.87)%, $P<0.05$], but increase in cell viability [(86.33±4.51)% *vs* (66.33±8.50)%, $P<0.05$] as well as HIF-1α protein expression ($P<0.05$). Furthermore, immunofluorescence assay showed that HIF-1α was mainly distributed in the nucleus and perinucleus. **Conclusion** Roxadustat attenuates heat stress-induced apoptosis and senescence of renal tubular epithelial cells by upregulating HIF-1α.

[**Key words**] heat stress; roxadustat; HIF-1α; apoptosis; senescence

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX1101). Corresponding author: DAI Huanzi, E-mail: dhz084426@163.com

热射病(heat stroke,HS)是最严重的中暑类型,主要表现为核心体温迅速升高超过40 ℃,伴有循环衰竭和多器官功能障碍。热射病相关急性肾损伤(heat stroke-Acute kidney injury,HS-AKI)是HS严重的并发症之一[1-2]。已有研究报道,直接热损伤、脱水、微血栓形成引起的缺血、横纹肌溶解等均会导致HS-AKI的发生[3]。目前,HS的治疗方式以降温等对症支持治疗为主[4],尚未有推荐用于预防及治疗HS的有效药物。因此亟需探索有效的防治措施。

XUE等[5]研究发现HS小鼠肾脏中存在线粒体依赖性细胞凋亡,且PETROVA等[6]发现热打击可引起单链DNA断裂导致处于S期的细胞发生衰老样生长停滞,提示热打击也可引起细胞衰老。缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)是细胞对缺氧反应重要的转录调节因子,在常氧条件下HIF-1α被泛素-蛋白酶体系统迅速降解,然而缺氧会抑制该降解途径,并诱导HIF-1α进入细胞核与HIF-1β结合形成异源二聚体,激活缺氧相关基因的转录,如血管内皮生长因子、促红细胞生成素等[7-8],从而促进红细胞生成及血管新生等,以适应缺氧环境。研究报道上调HIF-1α介导的线粒体自噬可抑制NLRP3炎症小体,降低肾小管细胞凋亡水平,进而减轻AKI[9]。HIF-1α还可通过诱导自噬延缓干细胞衰老,预防癌症、神经退行性疾病和代谢性疾病的发生[10]。罗沙司他作为缺氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂,可稳定HIF-1α表达[11],在多种AKI动物实验模型中已证实罗沙司他可通过上调HIF-1α减轻炎症反应、凋亡、氧化应激等发挥肾脏保护作用[12-14],但其在热打击诱导的肾损伤中作用尚不明确。因此本研究通过建立热打击HK-2细胞模型,模拟在体HS-AKI的过程,探讨罗沙司他是否能通过上调HIF-1α减轻热打击导致的肾脏损伤。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

HK-2细胞(人肾小管上皮细胞)由重庆医科大学廖晓辉教授赠送;罗沙司他胶囊购自珐博进(中国)医药技术开发有限公司(批号:H20180024);胎牛血清(Gibco,C0235)、青-链霉素溶液(C0222)、胰酶(C0203)、RIPA裂解缓冲液(P0013B)、DAPI染色液(C1005)、一步TUNEL细胞凋亡测定试剂盒(C1090)、细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒(C0602)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Cell Counting Kit-8细胞增殖毒性检测试剂盒CCK-8(CK04)购自东仁化学科技(上海)有限公司;RPMI1640培养基(SH30809.01)购自Hyclone公司;Cleaved Caspase-3(9664S)、β-actin(3700S)购自美国Cell Signaling Technology公司;p21(ab109199)、p16(ab189034)一抗购自英国abcam公司;HIF-1α(AF1009)购自Affinity公司;DMSO溶液(D8370)购自Solarbio公司;BCA蛋白检测试剂盒及其他Western blot常规试剂均购自雅酶生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组及造模 将复苏后的HK-2细胞培养在含有10%胎牛血清和1%青-链霉素溶液的完全培养基中,置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养。当细胞生长达到80%后,经胰酶消化并计数,细胞数为1×10^6/mL,随后接种于6孔板中孵育24 h进行后续实验。实验分为对照组、罗沙司他组(30 μmol/L罗沙司他预处理24 h)、热打击组(在43 ℃、5% CO_2的培养箱中处理2 h)、热打击+罗沙司他组(30 μmol/L罗沙司他处理24 h后在43 ℃、5% CO_2的培养箱中处理2 h)。

1.2.2 CCK-8法检测细胞活力 常规消化、重悬细胞,并调整细胞数为1.0×10^5/mL,取100 μL细胞悬液加入到96孔板中37℃、5% CO_2的条件下培养24 h,使细胞贴壁。然后每孔加入10 μL不同浓度的罗沙司他溶液(10、20、30、40、50 μmol/L)培养24 h。接着每孔加入10 μL CCK-8溶液,在培养箱内培养2 h。用酶标仪测定在450 nm处的光密度值[D(450)]。根据D(450)值计算细胞活力。

1.2.3 Western blot检测HIF-1α、Cleaved Caspase-3、p16、p21的表达 裂解各组细胞后,4 ℃ 18 890×g离心20 min,取上清液并用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸变性,上样40 μg后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,再将蛋白转至0.22 μm PVDF膜上,经无蛋白快速封闭液封闭40 min后,将膜与一抗HIF-1α(1∶1 000)、Cleaved Caspase-3(1∶1 000)、p16(1∶1 000)、p21(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000)4 ℃孵育过夜;TBST洗涤5 min×3次,室温孵育二抗1 h,TBST洗涤5 min×3次。显影,发光。Image J软件分析蛋白条带灰度值,目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.2.4 免疫荧光检测HIF-1α表达及分布 将细胞以1×10^4/孔接种于爬片上培养24 h,按分组给予罗沙司他和热打击处理后,用PBS洗涤5 min×2次。在室温用4%多聚甲醛固定30 min后,用PBS洗涤3次,再用0.3%Triton X-100通透15 min。随后用免疫荧光封闭液封闭1 h,PBS洗涤5 min×3次,4 ℃过夜孵育HIF-1α(1∶100)。复温30 min后,PBS洗涤3次,再用山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor® 488)(Abcam,ab150077,1∶200)在室温下孵育1.5 h。用DAPI染色液对细胞核进行复染5 min。接着用PBS洗涤3次,封片后在荧光显微镜下观察拍照,用Image J软件分析相对荧光强度。

1.2.5 β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况 将细胞接种于6孔板中,给予罗沙司他和热打击处理后,吸除细胞培养液,用PBS洗涤1次,每孔加入1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15 min。吸除细胞固定液,用PBS洗涤细胞3次。根据试剂盒说明书配置染色工作液,每孔加入1 mL。用保鲜膜封住6孔板防止蒸发,在无CO_2孵育箱中37 ℃孵育过夜,在普通光学显微镜下观察,拍照并计数阳性细胞占比。

1.2.6 TUNEL法检测细胞凋亡情况 根据试剂盒说明书配制适当量的TUNEL检测液,充分混匀。PBS洗涤2次。每孔加入100 μL TUNEL检测液,37 ℃避光孵育60 min。PBS洗涤3次。用抗荧光淬灭封片剂封片后,在荧光显微镜下观察、拍照。凋亡细胞核被染成红色,正常细胞核呈蓝色。

凋亡率=凋亡阳性细胞/正常细胞核×100%

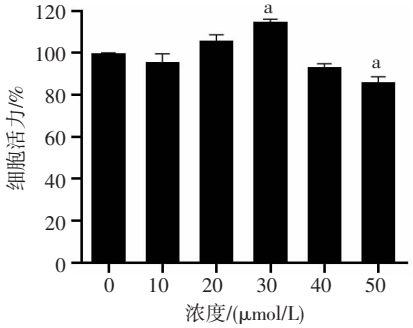
1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0进行统计分析,计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示。组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的罗沙司他对HK-2细胞活力的影响

CCK-8检测结果(图1)显示:30 μmol/L罗沙司他处理HK-2细胞24 h后,细胞活力显著增加($P<0.05$),提示该浓度罗沙司他无细胞毒性且能够促进细胞增殖;而当浓度超过40 μmol/L时,细胞活力显著降低($P<0.05$),表现出细胞毒性。

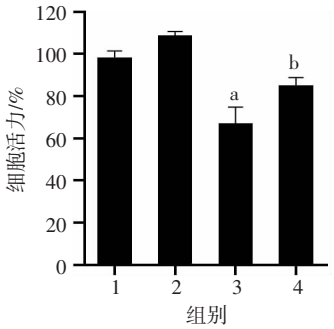


a:$P<0.05$,与0 μmol/L比较

图1 不同浓度罗沙司他对HK-2细胞活力的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.2 罗沙司他减轻热打击诱导的HK-2细胞活力降低

为明确罗沙司他对热打击处理的HK-2细胞是否具有保护作用,先使用30 μmol/L罗沙司他处理HK-2细胞,随后进行热打击处理。CCK-8检测结果显示(图2):与对照组比较,热打击组细胞活力显著下降($P<0.05$);而与热打击组比较,热打击+罗沙司他组细胞活力显著增加($P<0.05$)。结果提示罗沙司他对热打击处理的HK-2细胞存在保护作用。



1:对照组;2:罗沙司他组;3:热打击组;4:热打击+罗沙司他组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与热打击组比较

图2 罗沙司他预处理对热打击HK-2细胞活力的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3　罗沙司他进一步上调热打击后 HIF-1α 表达水平

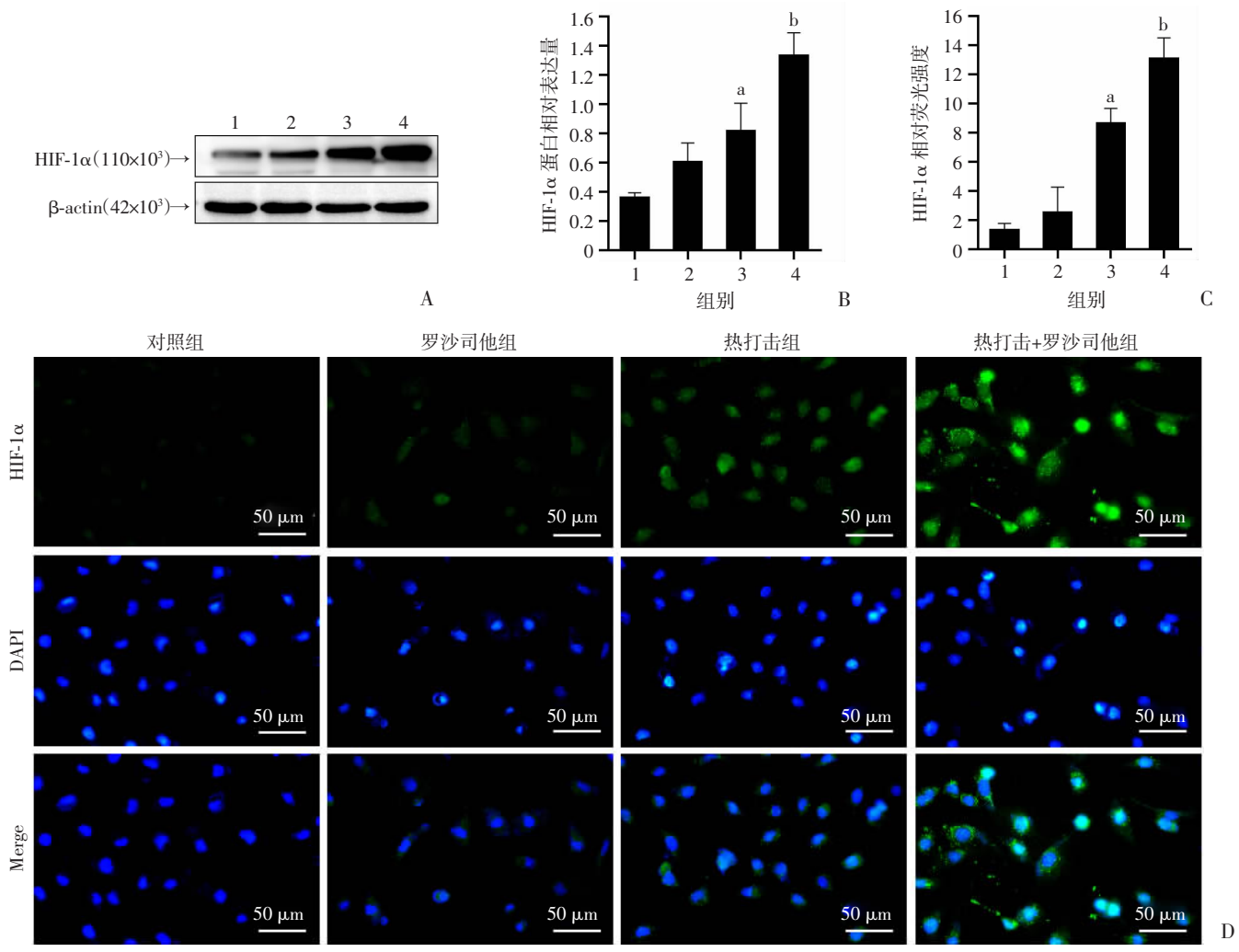
Western blot 检测结果(图 3A、B)显示:与对照组比较,热打击组和热打击+罗沙司他组 HIF-1α 蛋白表达水平显著增加(P<0.05);其中,热打击+罗沙司他组 HIF-1α 蛋白表达水平高于热打击组。免疫荧光趋势(图 3C、D)与 Western blot 结果一致,并且显示 HIF-1α 主要分布在 HK-2 细胞的细胞核及细胞核周围。结果提示热打击可上调 HIF-1α,而罗沙司他可进一步上调 HIF-1α。

2.4　罗沙司他减轻热打击诱导的细胞凋亡

Western blot 检测结果(图 4A、B)显示:与对照组比较,Cleaved Caspase-3 蛋白表达在热打击组显著增加(P<0.05);与热打击组比较,热打击+罗沙司他组 Cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低(P<0.05)。TUNEL 染色结果(图 4C、D)与 Western blot 检测结果一致。

2.5　罗沙司他减轻热打击诱导的应激性衰老

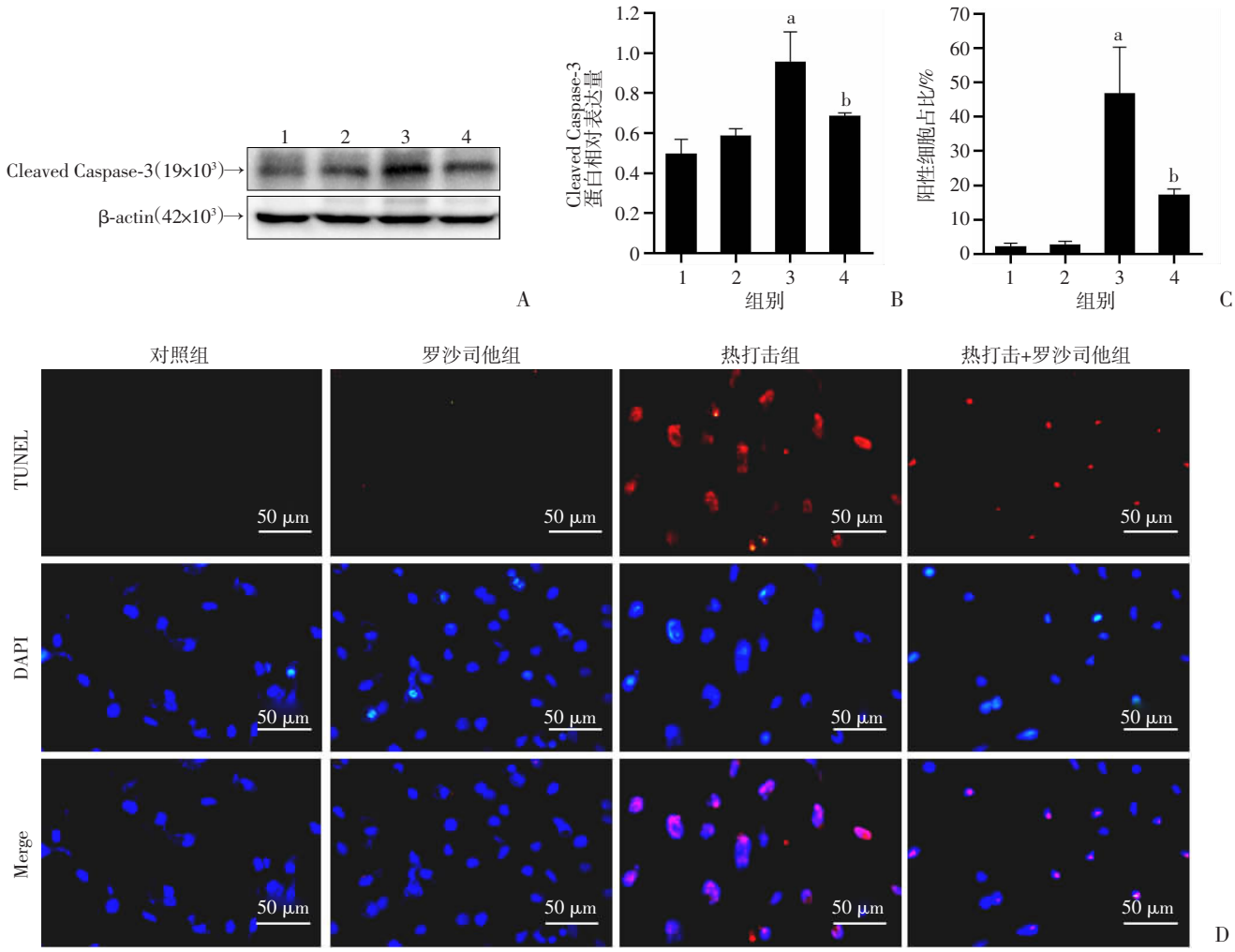
Western blot 检测结果(图 5)显示:与对照组比较,热打击组 p21、p16 蛋白水平显著增加(P<0.05)。与热打击组比较,热打击+罗沙司他组 p21、p16 蛋白水平显著降低(P<0.05)。SA-β-Gal 染色实验结果显示(图 6),与对照组比较,热打击组和热打击+罗沙司他组衰老阳性细胞占比显著增加(P<0.05),但热打击组明显高于热打击+罗沙司他组(P<0.05)。结果提示罗沙司他可减轻热打击诱导的应激性衰老。



1:对照组;2:罗沙司他组;3:热打击组;4:热打击+罗沙司他组;a:P<0.05,与对照组比较;b:P<0.05,与热打击组比较

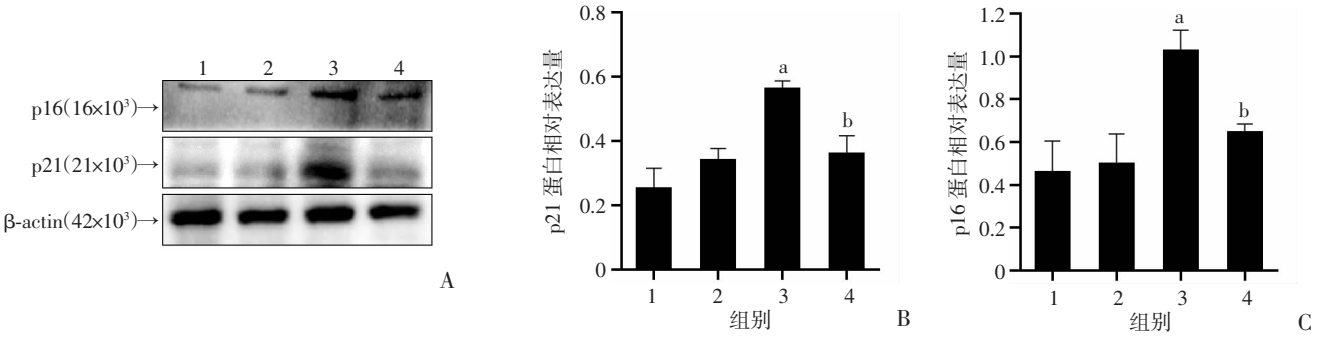
A:Western blot 检测;B:HIF-1α 半定量分析;C:荧光强度定量分析;D:免疫荧光观察

图 3　罗沙司他预处理对热打击 HK-2 细胞 HIF-1α 表达及分布的影响　(n=3,$\bar{x}\pm s$)



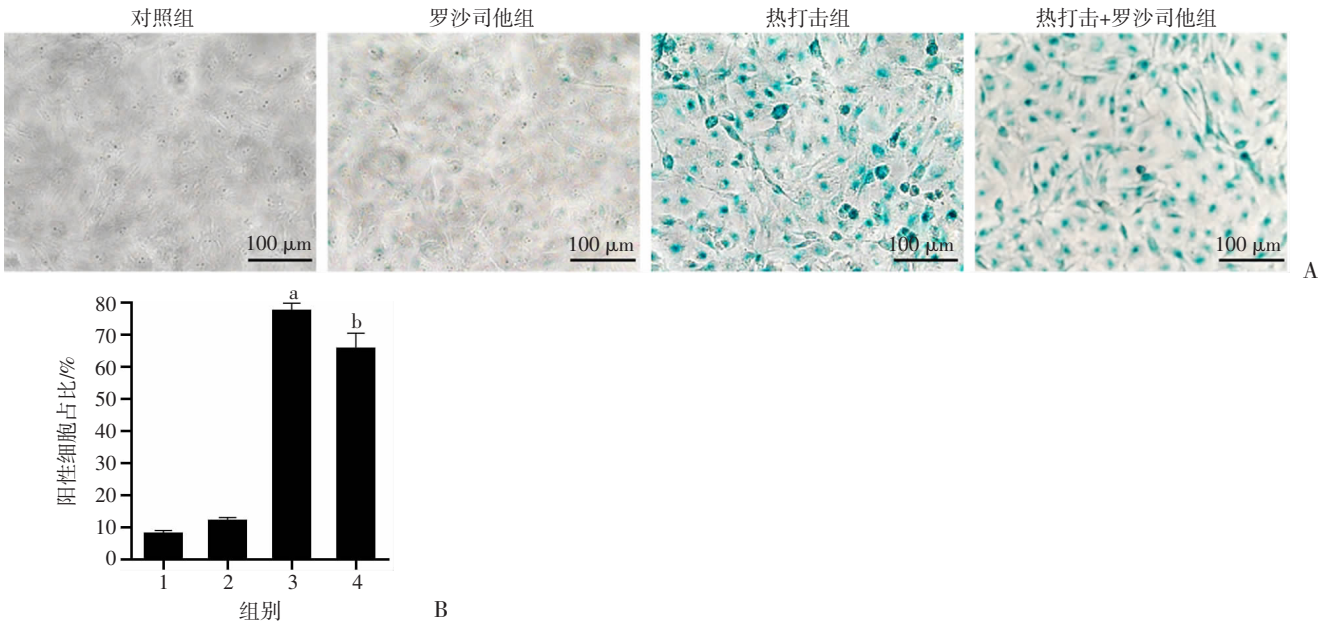
1:对照组;2:罗沙司他组;3:热打击组;4:热打击+罗沙司他组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与热打击组比较
A: Western blot 检测;B:Cleaved Caspase-3 半定量分析;C:各组阳性细胞占比; D:TUNEL 检测细胞凋亡 红色为凋亡阳性细胞,蓝色为细胞核

图 4 罗沙司他预处理对热打击 HK-2 细胞凋亡水平的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:罗沙司他组;3:热打击组;4:热打击+罗沙司他组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与热打击组比较
A:Western blot 检测;B:p21 蛋白半定量分析;C:p16 蛋白半定量分析

图 5 罗沙司他预处理对热打击 HK-2 细胞 p21、p16 蛋白表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:SA-β-Gal 染色观察;B:各组阳性细胞占比　1:对照组;2:罗沙司他组;3:热打击组;4:热打击+罗沙司他组　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与热打击组比较

图 6　罗沙司他预处理对热打击 HK-2 细胞 SA-β-Gal 活性的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

3　讨论

3.1　热打击诱导 HK-2 细胞凋亡和应激性衰老

HS 是一种危及生命的临床危重症。越来越多的证据表明,细胞凋亡可能在 HS 的发病过程中发挥重要作用。SAKAGUCHI 等[15]研究证明,将大鼠暴露在 41.5 ℃的温度下 2 h 可诱导肿瘤和正常组织发生细胞凋亡。ZHAO 等[16]研究报道,姜黄素可通过抑制线粒体凋亡途径预防劳力型 HS-AKI 中的肾细胞凋亡。本研究通过建立热打击 HK-2 细胞体外模型,发现热打击可引起 HK-2 细胞凋亡,主要表现为 Cleaved Caspase-3 和 TUNEL 阳性细胞占比较对照组显著升高,与既往研究结果一致。此外,热打击可引起牛间充质干细胞发生应激性衰老,导致干细胞抗炎、调节免疫等功能受到损害[17]。本研究也发现热打击可引起 HK-2 细胞发生应激性衰老,表现为热打击组 HK-2 细胞 p21、p16 蛋白表达和 SA-β-Gal 染色阳性细胞占比较对照组显著增加。

3.2　罗沙司他对热打击诱导的 HK-2 细胞损伤具有保护作用

大量研究表明,HIF-1α 在肾脏疾病中主要发挥保护作用。FU 等[18]通过体内外研究证明 HIF-1α-BNIP3 介导的线粒体自噬可通过抑制肾小管细胞凋亡和氧化应激防止肾缺血再灌注损伤。JIANG 等[19]研究发现 HIF-1α 通过 HO-1 通路改善肾小管细胞的线粒体功能障碍并抑制线粒体依赖性细胞凋亡,首次证明 HIF-1α 在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病肾病小鼠模型中的保护作用。目前,罗沙司他在临床上已广泛用于肾性贫血的治疗,2020 年 11 月中国医师协会肾脏内科医师分会发布的《中国肾性贫血诊疗的临床实践指南》明确指出“建议开展罗沙司他预防和治疗 AKI 的相关研究”。在酒精性肝病、偏头痛、肝纤维化等动物疾病模型中已证实罗沙司他可通过上调 HIF-1α 抑制脂质合成、凋亡、炎症反应、氧化应激等改善疾病预后[20-22]。为进一步明确罗沙司他对热打击的 HK-2 细胞是否具有保护作用,本研究用 CCK-8 检测不同浓度罗沙司他对 HK-2 细胞活力的影响,结果显示当浓度为 30 μmol/L 时,罗沙司他无细胞毒性且能够促进细胞增殖,因此后续采用该浓度进行实验。本研究发现,热打击+罗沙司他组的细胞活力明显高于热打击组,提示罗沙司他对热打击引起的 HK-2 细胞损伤确有保护作用。

3.3　罗沙司他通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的 HK-2 细胞凋亡

既往研究报道,罗沙司他可通过激活 HIF-1α 减轻肾脏损伤和肾小管细胞凋亡,进而减轻造影剂、顺铂、缺血再灌注等多种原因诱导的 AKI[12-13,22],但尚未评估其在 HS-AKI 中的作用。LIN 等[9]研究发现,用碘海

醇处理 HK-2 细胞可显著增加 HIF-1α 的表达,在碘海醇处理前用罗沙司他预处理可使 HIF-1α 进一步表达增加,同时减轻碘海醇诱导的 HK-2 细胞凋亡。本研究发现与对照组比较,热打击组 HIF-1α 蛋白表达及凋亡水平显著增加;与热打击组比较,热打击+罗沙司他组 HIF-1α 蛋白表达进一步增加,但 Cleaved Caspase-3 蛋白水平和 TUNEL 阳性细胞占比显著降低。结果提示热打击可引起 HIF-1α 应激性增加,但 HIF-1α 上升水平不足以抵抗热打击诱导的细胞损伤。而罗沙司他可通过特异性上调 HIF-1α,减轻热打击诱导的 HK-2 细胞凋亡。此外,免疫荧光结果发现 HIF-1α 主要分布于细胞核和细胞核周围。该结果提示稳定的 HIF-1α 易位至细胞核调控下游基因,与文献[7]所述一致。

3.4 罗沙司他通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的 HK-2 细胞衰老

LI 等[23]发现热打击可诱导睾丸细胞发生氧化应激,进而导致细胞衰老。而激活 HIF-1α 可引起端粒酶逆转录酶过表达,以维持端粒的稳定,减轻细胞衰老[24-25]。罗沙司他是否可通过上调 HIF-1α 减轻热打击引起的细胞衰老尚未报道。本研究通过检测 p21、p16 蛋白表达和 SA-β-Gal 染色发现,热打击+罗沙司他组 p21、p16 蛋白表达和 SA-β-Gal 染色阳性细胞占比较热打击组显著降低,证实了罗沙司他可通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的 HK-2 细胞衰老。

综上所述,本研究显示罗沙司他可通过上调 HIF-1α 减轻热打击诱导的肾小管上皮细胞凋亡和衰老。但遗憾的是,本研究未进行体内实验,接下来我们将重点探讨罗沙司他在 HS-AKI 动物模型中的作用,若能得到相似的结论,那么罗沙司他将可能成为热射病防治的潜在药物。

参考文献:

[1] ELINDER C G. Heat stroke—the tip of an iceberg[J]. J Intern Med, 2023, 294(1): 4-6. DOI: 10.1111/joim.13645.

[2] SASAI F, RONCAL-JIMENEZ C, ROGERS K, *et al*. Climate change and nephrology[J]. Nephrol Dial Transplant, 2023, 38(1): 41-48. DOI: 10.1093/ndt/gfab258.

[3] BOUCHAMA A, ABUYASSIN B, LEHE C, *et al*. Classic and exertional heatstroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1): 8. DOI: 10.1038/s41572-021-00334-6.

[4] THONGPRAYOON C, QURESHI F, PETNAK T, *et al*. Impact of acute kidney injury on outcomes of hospitalizations for heat stroke in the United States[J]. Diseases, 2020, 8(3): 28. DOI: 10.3390/diseases8030028.

[5] XUE L, GUO W L, LI L, *et al*. Metabolomic profiling identifies a novel mechanism for heat stroke-related acute kidney injury[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 241. DOI: 10.3892/mmr.2021.11880.

[6] PETROVA N V, VELICHKO A K, RAZIN S V, *et al*. Early S-phase cell hypersensitivity to heat stress[J]. Cell Cycle, 2016, 15(3): 337-344. DOI: 10.1080/15384101.2015.1127477.

[7] LIU H, Li Y, XIONG J. The Role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha in renal disease[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7318. DOI: 10.3390/molecules27217318.

[8] CHEN W, WU P, YU F, *et al*. HIF-1α regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases[J]. Cells, 2022, 11(22):3552. DOI: 10.3390/cells11223552.

[9] LIN Q S, LI S, JIANG N, *et al*. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2975-2990. DOI: 10.1080/15548627.2020.1848971.

[10] KIM C, PARK J M, SONG Y, *et al*. HIF1α-mediated AIMP3 suppression delays stem cell aging *via* the induction of autophagy[J]. Aging Cell, 2019, 18(2): e12909. DOI: 10.1111/acel.12909.

[11] HAASE V H. Hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors in the treatment of anemia of chronic kidney disease[J]. Kidney Int Suppl, 2021, 11(1): 8-25. DOI: 10.1016/j.kisu.2020.12.002.

[12] YANG Y, YU X, ZHANG Y, *et al*. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(7): 825-838. DOI: 10.1042/CS20171625.

[13] YANG H, WU Y, CHENG M, *et al*. Roxadustat (FG-4592) protects against ischaemia-induced acute kidney injury *via* improving CD73 and decreasing AIM2 inflammasome activation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2023, 38(4): 858-875. DOI: 10.1093/ndt/gfac308.

[14] LI X, JIANG B, ZOU Y, *et al*. Roxadustat (FG-4592) facilitates recovery from renal damage by ameliorating mitochondrial dysfunction induced by folic acid[J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 788977. DOI: 10.3389/fphar.2021.788977.

[15] SAKAGUCHI Y, STEPHENS L C, MAKINO M, *et al*. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats[J]. Cancer Res, 1995, 55(22):

5459-5464.

[16] ZHAO Y H, SHEN C F, KANG Y, *et al*. Curcumin prevents renal cell apoptosis in acute kidney injury in a rat model of dry-heat environment heatstroke *via* inhibition of the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(2): 126. DOI: 10.3892/etm.2020.9558.

[17] NIR D, RIBARSKI-CHOREV I, SHIMONI C, *et al*. Antioxidants attenuate heat shock induced premature senescence of bovine mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5750. DOI:10.3390/ijms23105750.

[18] FU Z J, WANG Z Y, XU L, *et al*. HIF-1α-BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101671. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101671.

[19] JIANG N, ZHAO H, HAN Y, *et al*. HIF-1α ameliorates tubular injury in diabetic nephropathy *via* HO-1-mediated control of mitochondrial dynamics[J]. Cell Prolif, 2020, 53(11): e12909. DOI: 10.1111/cpr.12909.

[20] GAO Y, JIANG X, YANG D, *et al*. Roxadustat, a hypoxia-inducible factor 1α activator, attenuates both long- and short-term alcohol-induced alcoholic liver disease[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:895710. DOI:10.3389/fphar.2022.895710.

[21] YANG D G, GAO Y Y, YIN Z Q, *et al*. Roxadustat alleviates nitroglycerin-induced migraine in mice by regulating HIF-1α/NF-κB/inflammation pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(2): 308-320. DOI: 10.1038/s41401-022-00941-3.

[22] LI H S, ZHOU Y N, LI L, *et al*. HIF-1α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria[J]. Redox Biol, 2019, 25: 101109. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101109.

[23] LI N, XIAO Y, WANG H, *et al*. Insulin desensitization and cell senescence induced by heat stress in pig testicular cell model[J]. Anim Biotechnol, 2023, 34(9): 4947-4956. DOI: 10.1080/10495398.2023.2214246.

[24] SONG H J, CHEN X Y, JIAO Q, *et al*. HIF-1α-mediated telomerase reverse transcriptase activation inducing autophagy through mammalian target of rapamycin promotes papillary thyroid carcinoma progression during hypoxia stress[J]. Thyroid, 2021, 31(2): 233-246. DOI: 10.1089/thy.2020.0023.

[25] TURKIEWICZ S, DITMER M, SOCHAL M, *et al*. Obstructive sleep apnea as an acceleration trigger of cellular senescence processes through telomere shortening[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12536. DOI: 10.3390/ijms222212536.

(收稿:2023-12-25;修回:2024-03-07)

(编辑 栗 嘉)