三溴丙酮酸通过调控有氧糖酵解—细胞焦亡抑制 低氧诱导的大鼠PASMCs增殖

汤程远^{1#} 田云娜^{2#} 程缘² 黄曼² 徐俊鹏² 林连根¹ 贾旭广³ 骆珍珍^{4*} 陈玲珑^{1*} 王万铁^{2*}
(¹温州市人民医院急诊科, 温州 325000; ²温州医科大学基础医学院病理学与病理生理学系, 温州 325000;
³宜宾学院体育与大健康学院, 宜宾 644000; ⁴乐清市第二人民医院妇产科, 温州 32500)

该文探讨了三溴丙酮酸(3-bromopyruvate, 3-BP)对低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细 摘要 胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)的作用及机制。取生长状态良好的 PASMCs, 在 其细胞密度为60%~70%时,细胞饥饿处理24h。随机将细胞分成4组:正常对照组(Normal组)、正 常+3-BP组(Normal+3-BP组)、低氧造模组(Hypoxia组)、低氧+3-BP组(Hypoxia+3-BP组)。通过 CCK-8检测3-BP抑制低氧诱导PASMCs增殖的最适浓度; EDU检测各组细胞增殖情况; Western blot 检测各组细胞己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)、丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、M2型 丙酮酸激酶(pyruvate kinase isozyme type 2, PKM2)、血清核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3, NLRP3), GSDMD 蛋白 N-端片段 (gasdermin D, GSDMD-N)、半胱氨酸蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、白细胞介素-1β(interleukin-1 beta, IL-1β)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18) 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的蛋白表达变化; 乳酸试剂盒检测各 组细胞乳酸含量;免疫荧光法检测各组细胞HK2、NLRP3基因表达情况;ELISA法检测各组细胞IL-16、IL-18蛋白含量。结果显示, 3-BP抑制低氧诱导的PAMSCs增殖的有效浓度为40 µmol/L。与Normal组相比, Hypoxia组 PAMSCs增殖显著增多 (P<0.000 1), PCNA蛋白表达水平明显上升 (P<0.05), HK2、PKM2蛋白表达水平显著上升(P<0.01), PDH蛋白表达水平明显下降(P<0.000 1), NLRP3 蛋白表达水平上升(P<0.01)、GSDMD-N蛋白表达水平上升(P<0.001)、P20蛋白表达水平上升 (P<0.05)、IL-1β蛋白表达水平上升(P<0.000 1)、IL-18蛋白表达水平上升(P<0.05); 乳酸含量明显 增多(P<0.000 1);免疫荧光显示HK2阳性表达细胞数显著增加(P<0.001)、NLRP3阳性表达细胞数 显著增加(P<0.000 1);各组肺组织IL-1β含量增多(P<0.001)、IL-18含量增多(P<0.01)。与Hypoxia 组相比, Hypoxia+3-BP组PAMSCs增殖显著减少(P<0.001), PCNA蛋白表达水平下降(P<0.01), HK2 蛋白表达水平明显下降(P<0.05)、PKM2蛋白表达水平明显下降(P<0.001), PDH蛋白表达水平上 升(P<0.01), NLRP3、GSDMD-N、IL-18蛋白表达水平下降(P<0.05), P20、IL-1β蛋白表达水平下 降(P<0.01); 乳酸含量明显降低(P<0.001); 免疫荧光显示HK2阳性表达细胞数显著减少(P<0.001)、 NLRP3阳性表达细胞数显著减少(P<0.000 1);各组肺组织 IL-1β、IL-18蛋白含量降低(P<0.05)。总 之, 3-BP通过调控有氧糖酵解-细胞焦亡抑制低氧诱导的大鼠PASMCs增殖。

关键词 肺动脉平滑肌细胞;三溴丙酮酸;糖酵解;细胞焦亡;低氧

温州市基础性科研项目(批准号: Y20220492)和宜宾学院科研培育项目(批准号: 2022PY23)资助的课题 "共同第一作者

收稿日期: 2024-07-24 接受日期: 2024-09-09

^{*}通信作者。Tel: 13587455962, E-mail: 1552486873@qq.com; Tel:13676440757, E-mail: 77587332@qq.com; Tel: 13587688106, E-mail: wwt@wmu.edu.en Received: July 24, 2024 Accepted: September 9, 2024

This work was supported by the Basic Public Scientific Research Project of Wenzhou Science and Technology Bureau (Grant No.Y20220492), and the Scientific Research Cultivation Program of Yibin University (Grant No.2022PY23)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-13587455962, E-mail: 1552486873@qq.com; Tel: +86-13676440757, E-mail: 77587332@qq.com; Tel: +86-13587688106, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

3-BP Inhibits Hypoxia-Induced Proliferation of RPASMCs by Regulating Aerobic Glycolysis-Pyroptosis

TANG Chengyuan^{1#}, TIAN Yunna^{2#}, CHENG Yuan², HUANG Man², XU Junpeng², LIN Liangen¹, JIA Xuguang³, LUO Zhenzhen^{4*}, CHEN Linglong^{1*}, WANG Wantie^{2*}

(¹Emergency Department, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China; ²Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

³College of Physical Education and Health, Yibin University, Yibin 644000, China;

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, the Second People's Hospital of Yueqing, Wenzhou 325000, China)

Abstract This article investigates the effect and mechanism of 3-BP (3-bromopyruvate) on hypoxiainduced PASMCs (pulmonary artery smooth muscle cells) in rats. PASMCs in good growth condition were taken. When the cell density was 60%-70%, the cells were starved for 24 h. The cells were randomly divided into four groups: normal control group (Normal group), normal+3-BP group (Normal+3-BP group), hypoxia model group (Hypoxia group), hypoxia+3-BP group (Hypoxia+3-BP group). CCK8 assay was used to detect the optimal concentration of 3-BP to inhibit hypoxia-induced PASMCs proliferation. Edu was used to detect cell proliferation in each group. The protein expressions of HK2, PDH, PKM2, NLRP3, GSDMD-N, caspase-1, P20, IL-18, IL-18 and PCNA in each group were detected by Western blot. Lactic acid content of cells was detected by lactic acid kit. Immunofluorescence method was used to detect the protein expression of HK2 and NLRP3 in each group. The protein levels of IL-1 β and IL-18 in each group were detected by Elisa. The results showed that the effective concentration of 3-BP to inhibit the proliferation of hypoxia-induced PAMSCs was 40 µmol/L. Compared with the Normal group, the proliferation of PAMSCs in the Hypoxia group was significantly increased (P < 0.000 1); the expression of PCNA protein was significantly increased (P < 0.05); the expression of HK2 and PKM2 protein was significantly increased (P < 0.01); the expression of PDH protein was significantly decreased (P < 0.000 1); the expression of NLRP3 protein was significantly increased (P < 0.01); the expression of GSDMD-N protein was significantly increased (P < 0.001); the expression of P20 protein was significantly increased (P < 0.05); the expression of IL-1 β protein was significantly increased (P<0.000 1); the expression of IL-18 protein was significantly increased (P<0.05). The lactic acid content increased significantly (P<0.000 1). Immunofluorescence showed that the number of cells with positive expression of HK2 was significantly increased (P < 0.001), and the number of cells with positive expression of NLRP3 was significantly increased (P < 0.000 1). The content of IL-1 β and IL-18 in lung tissues increased (P < 0.001), the content of IL-18 in lung tissues increased (P < 0.01). Compared with the Hypoxia group, the proliferation of PAMSCs in the Hypoxia+3-BP group was significantly decreased (P < 0.001); the protein expression of PCNA was decreased (P < 0.01); the protein expression of HK2 was decreased (P < 0.05); the protein expression of PKM2 was decreased (P < 0.001) and the protein expression of PDH was increased (P < 0.01). The protein expression of NLRP3, GSDMD-N and IL-18 decreased (P < 0.05), and the expression of P20 and IL-1 β proteins decreased (P < 0.01). The lactate content was significantly decreased (P < 0.001). The lactic acid content was significantly decreased (P < 0.001). Immunofluorescence showed that the number of cells with positive expression of HK2 was significantly decreased (P < 0.001), and the number of cells with positive expression of NLRP3 was significantly decreased (P < 0.000 1). The protein contents of IL-1 β and IL-18 in lung tissues of each group decreased (P < 0.05). In conclusion, 3-BP inhibits hypoxia-induced proliferation of rat PASMCs by regulating aerobic glycolysis-pyroptosis.

Keywords pulmonary arterial smooth muscle cell; 3-bromopyruvate; glycolysis; pyroptosis; hypoxia

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)通常 是指直接或间接导致肺动脉内压升高的疾病,其平 均肺动脉压>20 mmHg,其发病多与左侧心脏病与肺 部疾病相关,几乎所有类型的肺动脉高压都与不同 类型的血管重塑有关,包括肺动脉血管阻塞、硬化 和血管收缩,如果没有积极的治疗将导致右心室肥 大,心脏最终衰竭,这是PH患者死亡的主要原因^[1]。 而越来越多的证据表明血管周围炎症在PH患者和 肺血管重塑的起始或进展中发挥重要作用^[2],肺动 脉高压的发病机制与炎症密切相关。

三溴丙酮酸(3-bromopyruvate, 3-BP)是一种卤 代丙酮酸衍生物,是蛋白质中半胱氨酸残基的强烷 基化剂,在抑制能量代谢中起关键作用^[3],其分子式 是C₃H₃BrO₃,分子量为166.96。进一步的研究表明, 3-BP对不同类型的癌细胞,如乳腺癌^[4]、膀胱癌^[5]、 结肠癌^[6]和肝癌细胞^[7]等具有很强的抑制作用。3-BP 在上述疾病作用过程中,共同的作用特点是抑制有 氧糖酵解(aerobic glycolysis),且3-BP对肺动脉高压的 作用及其机制尚无广泛研究,据此推测PASMCs的 增殖和迁移与重编程代谢密切相关,3-BP可通过抑 制糖酵解拮抗PASMCs的增殖和存活,从而逆转肺 血管重塑。

细胞焦亡是一种由炎症小体启动的裂解性程序 性细胞死亡。近年来,细胞焦亡在PH中的重要作用 备受关注^[8-9]。在缺乏ASC(apoptosis-associated specklike protein)和NLRP3炎性小体的小鼠中,缺氧引起的 右心室压力升高和血管重构减弱,表明炎性小体在肺 动脉高压的发病机制中起重要作用^[8]。在Caspase-1 缺陷的小鼠中,缺氧引起的右心室压力升高和血管重 构减弱,加入IL-1β和IL-18后肺动脉平滑肌细胞增殖 增加,以上可表明Caspase-1是治疗肺动脉高压的潜在 靶点^[9]。有氧糖酵解是指细胞通常重新编程它们的 耗能代谢方式,优先利用糖酵解而非氧化磷酸化产生 腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)。有文献报 道,有氧糖酵解可促进炎性小体NLRP3的激活^[11],具 有促炎作用。此外,有氧糖酵解的终产物乳酸可促进 炎症因子的释放,抑制Caspase-1可逆转乳酸的这一 效应[12]。以上提示有氧糖酵解与细胞焦亡存在一定 的联系。近年研究报道,诸多癌症及慢性肺部疾病患 者均出现了糖代谢异常的现象^[13-15]。但3-BP是否能 调控PH有氧糖酵解目前尚无研究报道。因此,本研 究旨在通过低氧诱导的大鼠 PASMCs, 观察 3-BP对

PASMCs增殖的影响,并探讨其对有氧糖酵解--细胞 焦亡的干预机制,为3-BP在治疗PH的方向研究提供 了新思考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 大鼠原代肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary smooth muscle cells, RPASMCs), 购自江 苏齐氏生物科技公司。

1.1.2 实验主要试剂 3-BP购自美国Sigma公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自武汉普诺赛 生命科技有限公司; CCK-8试剂盒(Cell Counting Kit-8)购自上海陶术生物科技有限公司; BeyoClick[™] EdU-488细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物 技术有限公司; 乳酸(lactic acid, LD)测试盒购自南京 建成生物科技有限公司; 所有抗体均购自武汉三鹰 生物技术有限公司; 0.22 μm无菌过滤器购自广州洁 特生物过滤股份有限公司; 0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco公司; 抗荧光衰减封片剂购自北京索来宝科技 有限公司。

1.1.3 细胞分组及处理 取生长状态良好的细胞, 在其细胞密度为60%~70%时,细胞饥饿处理24h, 然后将其随机分为4组:正常对照组(Normal)、正 常+3-BP组(Normal+3-BP)、低氧造模组(Hypoxia)、 低氧+3-BP组(Hypoxia+3-BP)。Normal+3-BP组和 Hypoxia+3-BP组选用DMEM培养基配制的含终浓 度为40 μmol/L 3-BP的培养基常规培养,Normal组和 Hypoxia组选用DMEM培养基常规培养。Normal组和 Hypoxia组选用DMEM培养基常规培养。Normal组和 和Normal+3-BP组置于常氧箱内常规培养;Hypoxia 组和Hypoxia+3-BP组置于低氧箱内常规培养,氧气 浓度为3%^[16]。处理时间均为48h^[17]。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK-8检测各组细胞存活率 等待细胞完成贴壁,随后用移液枪吸去培养基,PBS清洗3次后加入等量无血清培养基置于细胞培养箱进行细胞饥饿,细胞饥饿处理时间为24h。细胞饥饿结束后弃去无血清培养基,PBS清洗3次,每组分别加入提前配制好的含药物的培养基(血清浓度为3%)^[18],常氧组和模型组依旧加入3%血清培养基。各自放入需要的气体浓度的培养箱内培养24h。弃去培养基,PBS清洗3次,每孔加入提前混匀的100 μL无血清培养基和10 μL CCK-8试剂,于常氧37 ℃环境下孵育

60 min,使用酶标仪于450 nm波长处测量吸光度(D) 值。细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白空吸光度)/(对 照孔吸光度-空白孔吸光度)]×100%。

1.2.2 EDU检测各组细胞增殖情况 用24孔板进 行细胞造模,根据试剂盒说明书配制2×EDU工作 液,随后37°C继续孵育细胞2h;孵育完成后,弃去细 胞培养液,每孔加入0.5 mL的多聚甲醛固定液,随后 室温静置大约15 min; 固定完成后, 固定液需用移液 枪吸出,洗涤液按照每孔1 mL的标准加入,共洗涤3 次,每次5 min;洗涤液吸干净后,每孔加入1 mL通透 液,室温放置大约15 min;通透完成后,重复操作;提 前配制点击添加剂溶液,每孔加入300 μL点击反应 液;摇床避光孵育30 min; 孵育完成后,洗涤液洗涤 3次,每次5 min; 1× Hoechst 33342溶液提前配制(使 用PBS将Hoechst 33342稀释后备用);洗涤液吸净后, 1× Hoechst 33342溶液按每孔1 mL进行加入, 室温 避光孵育10 min; 孵育完成后, 用抗荧光淬灭封片剂 进行封片并用尼康正置荧光显微镜进行观察; Azide 488发绿光; Hoechst 33342则为蓝色。

1.2.3 Western blot蛋白印迹分析各组细胞有氧糖 酵解及焦亡相关蛋白表达情况 细胞造模结束 后每孔加入200 μL细胞蛋白裂解液,于冰上充分裂 解15 min,裂解结束后置于预冷好的EP管中进行超 声, 超声时间为2 s, 间歇2 s, 功率为100~120 W, 至溶 液无黏稠为止,随后将EP管置于冰上静置10 min,充 分裂解后,4°C离心机12 000 r/min超速离心20 min, 吸取上清于新的EP管内,通过BCA法计算蛋白浓 度及上样量。制备凝胶,在恒压为60 V下进行 SDS-PAGE电泳,分裂后进行湿式电转膜,条件为400 mA, 时间为15 min~25 min。电转结束后,将PVDF膜放 在由TBST缓冲液配制的10%脱脂牛奶中,置于摇床 上室温封闭2h,用对应抗体HK2、PKM2、PDH、 NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1 P20、IL-1β、IL-18、PCNA(提前用一抗稀释液进行稀释1:1000)孵育 PVDF膜,4°C摇床过夜。TBST缓冲液洗膜后,加入 二抗(1:50 000), 置于摇床上室温孵育1 h。凝胶成像 完成后用ImageJ软件对条带进行灰度值分析。

1.2.4 乳酸(LD)试剂盒检测各组细胞乳酸含量 细胞造模结束后弃去培养基,PBS润洗1次,用胰酶 将细胞消化下来,1000 r/min室温离心10 min,弃去 上清留下细胞沉淀。PBS清洗细胞2次后加入100 μL PBS/孔进行超声,使用超声细胞破碎仪,300 W功率, 每次超声5 s, 间隔30 s, 重复5次, 细胞蛋白进行BCA 测定。根据试剂盒说明配制工作液。将不同浓度的 蛋白匀浆加入 5 mL EP管, 每个样品加入20 µL, 分 别加入上述试剂后充分混匀; 空白管与标准管样品 同样取20 µL于5 mL EP管后加入上述试剂, 37 °C水 浴准确反应10 min。反应结束后每管加入2 mL终止 液, 充分混匀后取反应液 250 µL/管于96孔板中, 使 用酶标仪于530 nm波长处测定吸光度(D)值。细胞 匀浆乳酸计算:乳酸含量=[(D_{测定}-D_{空白})/(D_{标准}-D_空 _白)]×[C_{标准}/Cpr]。C_{标准}:标准品浓度, 3 mmol/L; Cpr: 细胞蛋白匀浆浓度。

1.2.5 细胞免疫荧光检测各组细胞HK2、NLRP3蛋 白表达情况 细胞造模结束后弃去培养基,使用 PBS洗涤3次,每次5 min;使用4%多聚甲醛进行细胞 固定,室温孵育10 min,使用PBS洗涤3次,每次5 min; 0.25% TritionX-100室温孵育10 min, PBS洗涤3次,每 次5 min; 2.5%驴血清室温孵育30 min;弃去封闭液 后加入一抗HK2、NLRP3(1:100) 300 μL/孔,4°C孵 育过夜,PBS洗涤4次,每次10 min;荧光二抗(1:200) 室温孵育1 h,孵育完成后PBS洗涤4遍,每次10 min; DAPI染色封片后使用倒置显微镜进行观察。观察 时打开显微镜DAPI通道,快速找到细胞核定位后, 观察目的染色,先观察表达含量低的目的蛋白。

1.2.6 ELISA法测定各组细胞IL-1β以及IL-18含量 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加各浓度的标 准品50 µL; 分别设空白孔、待测样品孔; 在酶标包被 板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μL, 然后再加 待测样品10 µL;将样品加于酶标板孔底部,尽量不触 及孔壁,轻轻晃动混匀;每孔加入酶标试剂100 μL,空 白孔除外;用封板膜封板后置于37°C温育60 min;将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水20 倍稀释后备用; 去掉封板 膜,弃去液体甩干,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃 去,如此重复5次,拍干;每孔先加入显色剂A 50 µL, 再加入显色剂B 50 μL, 轻轻振荡混匀, 37 °C避光显 色15 min;每孔加终止液50 µL进行终止,反应15 min; 以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔的吸光度 (D)值。以标准物的浓度为横坐标, D值为纵坐标, 在 坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的D值由标准曲线 查出相应的浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际 浓度。

1.2.7 统计学分析 实验结果以平均数±标准误 (mean±SEM)表示, 数据统计采用Graghpad Prism 9.0

软件。根据 Shapiro-Wilk test检测正态分布,当数据 呈正态分布时,两组间均数比较采用*t*检验(Student's *t*-test),3组及3组以上均数间比较采用单因素方差分 析 (One-Way ANOVA); *P*<0.05表示差异有统计学意 义。

2 结果

2.1 CCK-8检测各组细胞的存活率

CCK-8结果显示, 40 μmol/L组的细胞活性开 始出现明显下降(*P*<0.000 1),因此选取40 μmol/L的 3-BP进行后续实验,见图1。

2.2 EDU检测各组细胞的增殖情况

EDU显示,与Normal组相比,Hypoxia组增殖 增多(P<0.0001),Normal+3-BP组增殖无明显变化 (P>0.05);与Hypoxia组相比,Hypoxia+3-BP组增殖 减少(P<0.001),见图2。

2.3 Western blot检测各组细胞有氧糖酵解蛋白 及焦亡相关蛋白表达情况

Western blot结果显示,与Normal组相比,Hypoxia组的HK2、PKM2蛋白表达水平上升(P<0.01), PDH蛋白表达水平下降(P<0.000 1);与Hypoxia组 相比,Hypoxia+3-BP组的HK2蛋白表达水平下降



n=4, *****P*<0.000 1.





A、B: EDU检测各组细胞的增殖情况。n=3; [™]P>0.05, ****P<0.000 1, ^{###}P<0.001。
A,B: EDU were used to detect cell proliferation in each group. n=3; [™]P>0.05, ****P<0.000 1, ^{###}P<0.001.
图2 3-BP对低氧诱导的PASMCs增殖的影响

Fig.2 Effect of 3-BP on proliferation of PASMCs induced by hypoxia

(P<0.05)、PKM2蛋白表达水平下降(P<0.001), PDH 蛋白表达水平上升(P<0.01)。以上结果显示糖酵解 蛋白在PH中发生了相应变化,提示糖酵解效应在 PH中出现上调,而3-BP可以逆转这一现象。与此同 时,与Normal组相比,Hypoxia组的NLRP3蛋白表达 水平上升(P<0.01)、GSDMD-N蛋白表达水平上升 (P<0.001)、P20蛋白表达水平上升(P<0.05)、IL-1β 蛋白表达水平上升(P<0.000 1)、IL-18蛋白表达水 平上升(P<0.05); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+3-BP 组的NLRP3、GSDMD-N、IL-18蛋白表达水平下降 (P<0.05)、P20、IL-1β蛋白表达水平下降(P<0.01)。 以上结果显示细胞焦亡蛋白在PH中表达水平下 降,而3-BP可以逆转这一现象。同时,与Normal组 相比, Hypoxia组PCNA蛋白表达水平增高(P<0.05), Normal+3-BP组PCNA蛋白表达水平无明显变化 (P>0.05); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+3-BP组PCNA 蛋白表达水平降低(P<0.01),见图3。

2.4 乳酸(LD)试剂盒检测各组细胞的乳酸含量

乳酸试剂盒检测结果显示,与Normal组相比, Hypoxia组乳酸含量显著增多(P<0.000 1),Normal+3-BP组乳酸含量无明显变化(P>0.05);与Hypoxia组相 比,Hypoxia+3-BP组乳酸含量降低(P<0.001),见图4。 2.5 免疫荧光检测各组细胞HK2、NLRP3的表 达情况

免疫荧光结果显示,与Normal组相比,Hypoxia 组绿色荧光与红色荧光显著增强,HK2阳性表达细 胞数显著增加(P<0.001)、NLRP3阳性表达细胞数 显著增加(P<0.000 1);Normal+3-BP绿色荧光与红 色荧光无明显变化,HK2和NLRP3阳性表达细胞数 无明显变化(P>0.05);与Hypoxia组相比,Hypoxia+3-BP组绿色荧光与红色荧光强度降低,HK2阳性表达 细胞数显著减少(P<0.001)、NLRP3阳性表达细胞 数显著减少(P<0.000 1),见图5。

2.6 ELISA检测各组细胞IL-1β、IL-18的含量

与 Normal组相比, Hypoxia组 IL-1β蛋白含 量增多(P<0.001)、IL-18蛋白含量增多(P<0.01), Normal+3-BP组 IL-1β、IL-18蛋白含量无明显变化 (P>0.05); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+3-BP组IL-1β、 IL-18含量降低(P<0.05), 见图6。

3 讨论

肺动脉高压是一种远端肺动脉循环的进行性

·研究论文·

闭塞性血管病变,通常导致右心衰竭和死亡[19]。有 充分的证据表明, PASMCs的过度增殖和凋亡抵抗 是由线粒体功能障碍引起的,这是介导PH关键过 程的核心机制[20-21]。因此,通过药物来纠正线粒体 功能障碍可能是PH的重要治疗策略。3-BP是一种 卤化丙酮酸衍生物,对蛋白质中的半胱氨酸残基有 很强的烷基化作用, 在抑制能量代谢中起着关键作 用^[3]。据报道, 糖酵解抑制剂 3-BP通过抑制己糖激 酶II(hexokinase 2, HK2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和 ATP表达来防止各种肿瘤的生长并促进癌细胞凋亡, 从而增强线粒体功能[3]。此外,有报道称磷脂酰肌 醇-3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白 激酶B(protein kinase B, AKT)/雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在调节细胞增 殖中起着关键作用,且该通路的激活已被证明可以 促进PASMCs的增殖,这在诱导Warburg效应中起着 重要作用。本实验研究结果显示,在低氧诱导的PH 中,有氧糖酵解效应增强、细胞焦亡出现增多可能 是PH的致病因素, 而3-BP可能通过抑制有氧糖酵解 效应以及细胞焦亡来减轻低氧诱导的PH。

细胞焦亡与肺动脉高压的发生密切相关^[24-25]。 在MCT诱导的PH大鼠中,解毒祛瘀汤改善了其右心 组织的病理损伤,降低了心力衰竭和IL-1β和IL-18的 表达水平并下调了右心组织的细胞焦亡相关蛋白的 表达水平^[24]。在低氧诱导的PASMCs中,神经胶质 瘤相关的癌基因家族锌指蛋白1可能通过ASC促进 PASMCs发生细胞焦亡从而促进PH的发展^[25]。本实 验研究结果与上述文献报道的结果相似,细胞焦亡 参与了低氧诱导的PH。

Warburg效应描述了有氧糖酵解,其中细胞通常 重新编程其能量代谢,以优先利用糖酵解而不是氧 化磷酸化来产生ATP^[24]。最近的研究表明,Warburg 效应在PH的发展中起着重要作用,这涉及PASMCs 的异常增殖^[26]和内皮功能障碍^[27]。证据表明IL-1β、 NLRP3炎症小体与脂质和碳水化合物代谢之间存 在着密切关系^[28]。有氧糖酵解的终产物乳酸可促进 炎症因子的释放,且通过抑制Caspase-1可逆转乳酸 的效应^[11]。以上提示有氧糖酵解与细胞焦亡存在一 定的联系。因此,本实验检测有氧糖酵解和细胞焦 亡相关指标,发现Hypoxia组PAMSCs细胞增殖增多, 有氧糖酵解相关蛋白HK2、PKM2蛋白表达水平上 升,PDH蛋白表达水平下降,乳酸含量显著上升;细



A、B:各组细胞有氧糖酵解相关蛋白表达情况; C、D:各组细胞焦亡相关蛋白表达情况; E、F:各组细胞PCNA蛋白水平。n=3, ¹⁶P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, ****P<0.0001, ****P<0.001, ****P<0.001

A,B: expression changes of glycolysis related proteins in each group; C,D: expression changes of pyroptosis related proteins in each group; E,F: protein level of PCNA in each group. n=3, $^{15}P=0.05$, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ***P<0.0001, **P<0.005, $^{##}P<0.001$, $^{###}P<0.001$.

图3 各组PASMCs中有氧糖酵解以及细胞焦亡相关蛋白的表达变化

Fig.3 Expression changes of glycolysis and pyroptosis related proteins in each group



n=4, n=2, n=2,

图4 3-BP对各组PASMCs乳酸含量的影响 Fig.4 Effect of 3-BP on lactic acid content in PASMCs of different groups



A:各组细胞的HK2、NLRP3的免疫荧光表达;B、C:各组细胞的HK2、NLRP3的免疫荧光强度统计。*n*=3, ^mP>0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001, ^{###}P<0.0001。

A: immunofluorescence expression of PASMCs HK2 and NLRP3 in each group; B,C: statistics of immunofluorescence intensity of PASMCs HK2 and NLRP3 in each group. n=3, nsP>0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001, ####P<0.0001.

图5 3-BP对各组HK2、NLRP3的免疫荧光表达的影响

Fig.5 Effect of 3-BP on the immunofluorescence expression of HK2 and NLRP3 in each group

胞焦亡相关蛋白如NLRP3等表达水平上升, IL-1β、 IL-18含量增多。而使用3-BP后PAMSCs增殖显著减 少,有氧糖酵解相关蛋白HK2、PKM2蛋白表达水平 均明显下降, PDH蛋白表达水平上升,乳酸含量明显

降低;细胞焦亡相关蛋白如NLRP3等表达水平显著 下降,IL-1β、IL-18含量显著降低。这提示3-BP可能 通过调控有氧糖酵解减轻PAMSCs焦亡,从而抑制 PAMSCs增殖。



A: 各组细胞的IL-1β的含量统计图; B: 各组细胞的IL-18的含量统计图。*n*=3, ^{ms}*P*>0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, [#]*P*<0.05。 A: statistical chart of IL-1β content in PASMCs of each group; B: statistical chart of IL-18 content in PASMCs of each group. *n*=3, ^{ms}*P*>0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, [#]*P*<0.05.

图6 3-BP对各组PASMCs IL-1β、IL-18水平的影响 Fig.6 Effect of 3-BP on IL-1β and IL-18 protein levels in each group

综上所述, 3-BP可通过拮抗有氧糖酵解介导的细胞焦亡, 从而抑制低氧诱导的大鼠 PASMCs增殖。本实验的结果为3-BP在PH中的临床应用提供了新思考。

参考文献 (References)

- MOCUMBI A, HUMBERT M, SAXENA A, et al. Pulmonary hypertension [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1): 1.
- [2] HU Y, CHI L, KUEBLER W M, et al. Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. Cells, 2020, 9(11): 2338.
- [3] AZEVEDO-SILVA J, QUEIRÓS O, BALTAZAR F, et al. The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside [J]. J Bioenerg Biomembr, 2016, 48(4): 349-62.
- [4] KWIATKOWSKA E, WOJTALA M, GAJEWSKA A, et al. Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in noninvasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. J Bioenerg Biomembr, 2016, 48(1): 23-32.
- [5] KONSTANTAKOU E G, VOUTSINAS G E, VELENTZAS A D, et al. 3-BrPA eliminates human bladder cancer cells with highly oncogenic signatures via engagement of specific death programs and perturbation of multiple signaling and metabolic determinants [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 135.
- [6] HO N, MORRISON J, SILVA A, et al. The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression [J]. Biosci Rep, 2016, 36(1): e00299.
- [7] SUN X, SUN G, HUANG Y, et al. 3-Bromopyruvate regulates the status of glycolysis and BCNU sensitivity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 177: 113988.
- [8] CERO F T, HILLESTAD V, SJAASTAD I, et al. Absence of the inflammasome adaptor ASC reduces hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,

2015, 309(4): L378-87.

- [9] UDJUS C, CERO F T, HALVORSEN B, et al. Caspase-1 induces smooth muscle cell growth in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2019, 316(6): L999-11012.
- [10] PENG H, XIAO Y, DENG X, et al. The Warburg effect: a new story in pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Chim Acta, 2016, 461: 53-8.
- [11] WANG R, WANG S Y, WANG Y, et al. The Warburg effect promoted the activation of the NLRP3 inflammasome induced by Ni-refining fumes in BEAS-2B cells [J]. Toxicol Ind Health, 2020, 36(8): 580-90.
- [12] XIE M, YU Y, KANG R, et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13280.
- [13] JEONG H, KIM S, HONG B J, et al. Tumor-associated macrophages enhance tumor hypoxia and aerobic glycolysis [J]. Cancer Res, 2019, 79(4): 795-806.
- [14] CHU Z, HUO N, ZHU X, et al. FOXO3A-induced LINC00926 suppresses breast tumor growth and metastasis through inhibition of PGK1-mediated Warburg effect [J]. Mol Ther, 2021, 29(9): 2737-53.
- [15] WU T, YANG Y, ZHANG B, et al. EDDM3A drives gastric cancer progression by promoting HIF-1α-dependent aerobic glycolysis [J]. Oncogenesis, 2022, 11(1): 3.
- [16] SHENG H, YOU G Z, CHEN M Q, et al. RAS protein activator like 2 promotes the proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cell through AKT/mammalian target of Rapamycin complex 1 pathway in pulmonary hypertension [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 3516-26.
- [17] 毛稼琦,马兰,刘川川,等. 红景天苷抑制低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞的表型转化[C]//中国实验动物学会.第十六届中国实验动物科学年会论文集.青海大学高原医学研究中心:中国实验动物学会,2023,146-7.

- [18] 白相书,黄曼,田云娜,等.三七总皂苷对低氧状态下大鼠 PASMCs增殖、凋亡及Notch3通路的影响[J].中国病理生理 杂志(BAIX S, HUANG M, TIAN Y N, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation, apoptosis and Notch3 pathway of rat PASMCs under hypoxia [J]. Chinese Journal of Pathophysiology), 2023, 39(10): 1765-72.
- [19] VAZQUEZ Z G S, KLINGER J R. Guidelines for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. Lung, 2020, 198(4): 581-96.
- [20] CULLEY M K, CHAN S Y. Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: beyond mountains there are mountains [J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3704-15.
- [21] BOUCHERAT O, PETERLINI T, BOURGEOIS A, et al. Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(1): 90-103.
- [22] XIAO Y, PENG H, HONG C, et al. PDGF promotes the Warburg effect in pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1α signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1603-13.
- [23] ZHANG H, GONG Y, WANG Z, et al. Apelin inhibits the prolif-

eration and migration of rat PASMCs via the activation of PI3K/ Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(3): 542-53.

- [24] MA Q, WANG M, LI L, et al. Jiedu Quyu Decoction mitigates monocrotaline-induced right-sided heart failure associated with pulmonary artery hypertension by inhibiting NLRP3 inflammasome in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116556.
- [25] HE S, MA C, ZHANG L, et al. GLI1-mediated pulmonary artery smooth muscle cell pyroptosis contributes to hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 318(3): L472-I82.
- [26] PENG H, XIAO Y, DENG X, et al. The Warburg effect: a new story in pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Chim Acta, 2016, 461: 53-8.
- [27] THENAPPAN T, ORMISTON M L, RYAN J J, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management [J]. BMJ, 2018, 360: j5492.
- [28] WEN H, TING J P, O'NEILL L A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases: did Warburg miss inflammation [J]? Nat Immunol, 2012, 13(4): 352-7.