

硫化氢对低氧诱导的肺动脉内皮细胞铜死亡的干预

黄曼^{1#} 周海珍^{2#} 程缘¹ 韩丛美³ 袁琳波³ 尤利益^{4*} 王万铁^{1*}

¹温州医科大学基础医学院病理学与病理生理学系, 温州 325035; ²乐清市城南街道社区卫生服务中心, 温州 325600; ³温州医科大学基础医学院机能学系, 温州 325035; ⁴温州市人民医院超声科, 温州 325400

摘要 该文探讨了外源性硫化氢供体—硫化氢(NaHS)对低氧(hypoxia)诱导的人肺动脉内皮细胞(HPAEC)功能、代谢的影响及其机制。采用免疫荧光法进行细胞鉴定,通过CCK-8法确定NaHS抑制低氧诱导HPAEC损伤的最适浓度。ELISA法检测HPAEC内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列环素(prostacyclin I₂, PGI₂)的含量;荧光法检测各组HPAEC中Cu⁺浓度;Western blot法检测铜转运蛋白CTR1、ATP7A、ATP7B以及铜死亡指标FDX1、LIAS、DLAT、DLAT Dimer、DLST水平;RT-qPCR法检测*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD* mRNA表达水平;免疫荧光法检测FDX1和DLAT蛋白表达情况;JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测细胞线粒体膜电位变化;化学发光法检测细胞中的ATP含量;ELISA法检测丙酮酸脱氢酶E1亚基α1(pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, PDHA1)含量;磺基水杨酸法检测柠檬酸(citric acid, CA)含量。研究结果显示:NaHS抑制低氧诱导的HPAEC损伤的最佳浓度为200 μmol/L。低氧条件下,内皮细胞分泌性介质ET-1的浓度升高,NO和PGI₂的浓度降低;细胞中Cu⁺浓度明显增多,铜转运蛋白1表达显著上调,铜外排蛋白ATP7A/B表达显著下调,铜死亡指标FDX1、LIAS、DLAT、DLST表达水平均显著下调,且DLAT Dimer表达水平显著上调;铜死亡*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD*基因表达水平均显著下调;同时线粒体功能指标JC-1和ATP表达水平显著降低;三羧酸循环指标PDHA1和CA含量显著降低。加入NaHS(200 μmol/L)后,上述指标的异常变化均被不同程度逆转。研究结果表明:缺氧可引发HPAEC铜死亡,导致细胞线粒体功能、代谢紊乱;NaHS可通过抑制铜死亡改善低氧诱导的HPAEC功能、代谢紊乱。

关键词 硫化氢;肺动脉内皮细胞;铜死亡;低氧;铜离子

The Intervention of Sodium Hydrosulfide on Cuproptosis in Pulmonary Arterial Endothelial Cells under Hypoxia

HUANG Man^{1#}, ZHOU Haizhen^{2#}, CHENG Yuan¹, HAN Congmei³, YUAN Linbo³, YOU Liyi^{4*}, WANG Wantie^{1*}

¹Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²Yueqing City Chengnan Street Community Health Service Center, Wenzhou 325600, China;

³Department of Functional Medicine, School of Basic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

⁴Department of Ultrasound, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325400, China)

Abstract This study aims to explore the effects and mechanisms of exogenous hydrogen sulfide donor-NaHS (sodium hydrosulfide) on the function and metabolism of HPAECs (human pulmonary artery endothelial

收稿日期: 2025-11-05 接受日期: 2026-01-09

浙江省介入肺脏病重点实验室建设项目(批准号: 2019E10014)资助的课题

#共同第一作者

*通信作者。Tel: 0577-88059889, E-mail: youliyi@sohu.com; Tel: 0577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

Received: November 5, 2025 Accepted: January 9, 2026

This work was supported by the Zhejiang Key Laboratory of Interventional Pulmonary Disease (Grant No.2019E10014)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-577-88059889, E-mail: youliyi@sohu.com; Tel: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

cells) induced by hypoxia. Cell identification was performed using immunofluorescence. The optimal concentration of NaHS to inhibit hypoxia-induced HPAEC injury was determined using the CCK-8 assay. ELISA was used to measure the levels of ET-1 (endothelin-1), NO (nitric oxide) and PGI₂ (prostacyclin I₂) in HPAECs. Fluorescence was used to detect Cu⁺ concentration in each group of HPAEC. Western blot was used to detect copper transport proteins CTR1, ATP7A, ATP7B and cuproptosis markers FDX1, LIAS, DLAT, DLAT Dimer, DLST. RT-qPCR was used to detect the mRNA levels of *FDX1*, *LIAS*, *DLAT* and *DLD*. Immunofluorescence was used to observe the expression of FDX1 and DLAT. JC-1 mitochondrial membrane potential detection kit was used for monitoring changes in cellular mitochondrial membrane potential. ATP levels in cells were detected by chemiluminescence. ELISA was used to detect the content of PDHA1 (pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1). Sulfosalicylic acid method was used to measure CA (citric acid) content. The research results showed that the optimal concentration of NaHS to inhibit hypoxia-induced HPAEC injury was 200 μmol/L. Under hypoxic conditions, the concentration of the endothelial cell-secreted mediator ET-1 increased, while the concentrations of NO and PGI₂ decreased. Intracellular Cu⁺ levels rose significantly, copper transporter 1 expression was markedly upregulated, and copper efflux proteins ATP7A/B were significantly downregulated. The expression levels of cuproptosis markers FDX1, LIAS, DLAT, and DLST were significantly reduced, while DLAT Dimer expression was significantly increased. The expression levels of cuproptosis *FDX1*, *LIAS*, *DLAT* and *DLD* genes were all significantly downregulated. At the same time, mitochondrial function indicators JC-1 and ATP levels were significantly decreased, and tricarboxylic acid cycle indicators PDHA1 and CA contents were significantly reduced. After adding NaHS (200 μmol/L), the abnormal changes in the above indicators were all reversed to varying degrees. The study results indicate that hypoxia can trigger cuproptosis in HPAECs, leading to mitochondrial dysfunction and metabolic disorders; NaHS can improve hypoxia-induced HPAEC dysfunction and metabolic disorders by inhibiting cuproptosis.

Keywords sodium hydrosulfide; pulmonary artery endothelial cells; cuproptosis; hypoxia; copper ion

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种破坏性疾病, 其特征是严重的肺血管细胞不可逆的损伤, 内皮功能障碍可能是 PAH 的始动因素之一^[1]。PAH 具体发病机制尚不明确, 目前发现 PAH 常伴一氧化氮 (nitric oxide, NO) 通路和前列环素 (prostacyclin I₂, PGI₂) 通路的活性下调以及内皮素 G1 (endothelin G1, ETG1) 通路的过度激活^[2]。

研究表明, 铜是各种关键代谢酶的辅因子, 这些代谢酶推动了广泛的生理过程^[3]。铜死亡是一种由铜离子过量引起线粒体内蛋白质酰化过程异常而导致的细胞死亡方式, 其不同于其他已知的细胞死亡方式, 如细胞凋亡、焦亡 (pyroptosis) 和坏死性凋亡 (necroptosis), 是一种金属离子诱导的调节性细胞死亡^[4]。蛋白质脂酰化是一种赖氨酸翻译后修饰, 脂酰化蛋白通常存在于线粒体呼吸链的三羧酸循环中, 在铜过量条件下, 铜离子会直接结合到脂酰化蛋白 N-端丝氨酸残基上, 引起蛋白质构象的改变, 从而加重细胞的损伤^[5]。越来越多的证据表明, 铜在控制正常内皮细胞生长和伤口愈合中发挥着重要作用:

铜转运 ATP 酶 α (ATPase copper transporting alpha, ATP7A) 过表达可能导致血管内皮细胞功能障碍^[6]; 铜介导的自由基反应能损伤血管内皮细胞^[7]。以上研究提示, 内皮细胞的损伤与铜死亡存在着一定的联系。

硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 是一种无色、可燃的水溶性气体, 主要经胱硫醚 γ 裂解酶 (cystathionine γ lyase, CSE) 催化生成, 其在体内存在形式主要以硫化氢钠为主^[8]。H₂S 可以特异性结合癌细胞中的 Cu²⁺, 导致超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 活性的降低, 进而调控氧化还原稳态^[9], 还可以通过增强 Cu/Zn-SOD 活性逆转铜浓度降低缺氧心肌细胞中的活性氧水平^[10]。以上证据表明 H₂S 可以通过多条通路调控铜离子稳态。目前硫化氢钠是否能通过调控肺动脉内皮细胞铜死亡途径而缓解肺动脉高压, 还未有相应报道。因此, 本研究旨在建立低氧诱导的人肺动脉内皮细胞 (human pulmonary artery endothelial cells, HPAEC) 模型, 观察硫化氢钠对 HPAEC 中铜死亡的影响, 从而为肺动脉高压的防

治提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与主要试剂

IM-H746-1永生化人肺动脉内皮细胞系,由上海西梅生物科技有限公司提供;1001ECM内皮细胞培养基购自美国ScienCell公司;胎牛血清(FBS)购自南京森贝伽生物科技有限公司;CCK-8试剂盒购自美仑生物技术有限公司;人内皮素-1(endothelin-1, ET-1) ELISA定量检测试剂盒购自广东优品生物科技有限公司;FDX1一抗购自北京博奥龙生物科技有限公司; β -actin、硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase, LIAS)、DLAT、二氢硫辛酰胺-S-琥珀酰转移酶(dihydrolipoamide S-succinyltransferase, DLST)、铜转运蛋白1(copper transporter 1, CTR1)、ATP7A、ATP7B一抗均购自武汉博士德生物工程有限公司;FDX1、LIAS、DLAT、DLD引物合成由浙江鹭鸣生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制 主要试剂配制方法如下。(1)按照双抗:ECGF:FBS:ECM=1%:1%:10%:88%的比例配制10%完全培养液。(2)配制浓度为1 mmol/L的硫氢化钠母液:称取0.11 g硫氢化钠固体溶于1.962 mL PBS缓冲液,使用时合理稀释。

1.2.2 实验分组及HPAEC低氧模型的制备 取传代次数三代以后的HPAEC,在其细胞密度在70%~80%时常氧饥饿24 h,然后随机分为2组:对照(Control)组和低氧(Hypoxia)组,此两组细胞用来检测低氧条件下铜离子浓度的变化趋势并观察铜转运蛋白以及铜死亡相关蛋白的表达水平。之后使用同样的细胞密度,随机分为4组:对照(Control)组、对照+硫氢化钠(Control+NaHS)组、低氧(Hypoxia)组和低氧+硫氢化钠(Hypoxia+NaHS)组。其中Control+NaHS组和Hypoxia+NaHS组用终浓度为200 μ mol/L NaHS的培养液培养(药物浓度通过实验2得出),而Control组和Hypoxia组选用10%完全培养液常规培养。将Control组和Control+NaHS组细胞放入常氧箱,Hypoxia组和Hypoxia+NaHS组细胞放入低氧箱,常氧箱氧气浓度设置为21%,低氧箱氧气浓度设置为1%,处理时间均为24 h^[11-12]。

1.2.3 免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色 细胞接种于共聚焦小皿中培养,造模结束后,用4%多

聚甲醛室温固定细胞20 min,然后打孔封闭盒为一步(0.9 mL PBS+50 μ L山羊血清+50 μ L Triton X-100),滴加一抗(CD31、FDX1、DLAT稀释比例均为1:100)后放于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育12 h,用PBS洗涤后孵育荧光二抗(1:3 000),最后用DAPI染料染细胞核,及时使用荧光显微镜拍照并定量分析荧光强度。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活性 根据文献[13-14]对常氧条件下HPAEC设置不同浓度(0~800 μ mol/L)的NaHS以检测其对于HPAEC细胞的作用效果,实验步骤按CCK-8试剂盒说明书操作,最后在450 nm波长处测每孔的吸光度(D)值。

1.2.5 ELISA检测细胞ET-1、NO、PGI₂的含量 实验测定HPAEC中ET-1、NO、PGI₂水平采用双抗体夹心法。设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加相应浓度的标准品50 μ L,在酶标包被板上待测样品孔中按比例加样品稀释液和待测样品;每孔加入酶标试剂100 μ L,用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育60 min,经洗涤、拍干、显色等步骤后,于450 nm波长处测量各孔的吸光度(D)值。

1.2.6 荧光法检测细胞中Cu⁺的含量 6孔板进行细胞造模后,按照 1×10^6 个细胞加入200 μ L 0.9% NaCl溶液提取细胞到EP管中,4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g离心10 min取上清液。根据试剂盒说明书按照试剂一:双蒸水=1:9混匀配制试剂一工作液,随后设置空白孔和测定孔;在酶标板中每孔加入20 μ L待测样本,试剂一工作液每孔100 μ L,试剂二每孔100 μ L;振板5 s,37 $^{\circ}$ C孵育10 min。在395 nm激发波长、480 nm发射波长的条件下测定荧光值, $\Delta F = F_{\text{测定孔荧光值}} - F_{\text{空白孔荧光值}}$ 。

1.2.7 Western blot实验 细胞造模结束后每孔加入150 μ L细胞蛋白裂解液,裂解完成后收集细胞,之后4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心12 min吸取上清待用。以每孔40 μ g上样量进行蛋白电泳,按照蛋白分子量大小用快速电转液转膜不同时间,转膜结束后用快速封闭液封闭12~25 min。加一抗FDX1(稀释比例为1:3 000),一抗LIAS、DLAT、DLST和CTR1(稀释比例为1:1 500),一抗ATP7A和ATP7B(稀释比例为1:1 000)于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜孵育。第二天充分洗膜后,加入二抗(1:500)于37 $^{\circ}$ C孵育1 h,仪器曝光后保存条带图片,用Image-Fiji软件对条带进行分析。

1.2.8 RT-qPCR实验 细胞造模结束后每孔加入约500 μ L Trizol,用细胞刮刀刮取细胞于EP管中,随后加入100 μ L氯仿,充分涡旋后4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>FDX1</i>	Forward: CGG TCG CTG AGC GTG TC Reverse: AGC AGA GAA TCA CCA ACT TTT CC
<i>LIAS</i>	Forward: ATA TGC AGC CAA CAA GGC GT Reverse: CCA AAG GGC CAC TTG CAG TA
<i>DLAT</i>	Forward: CCT ACA CCT TCA GCA CCC TG Reverse: ACC ATC TGG TCC TGT CCC TT
<i>DLD</i>	Forward: TTG GCC AAG AGA GGC CAT TT Reverse: TCC TCC AGG ACC AGA ACC TA
<i>β-actin</i>	Forward: AAG AAG GTG GTG AAG CAG GC Reverse: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

离心 12 min, 取上清, 后加入异丙醇混匀再次离心 (4 °C、12 000 r/min 离心 12 min), 最后重复 3 次洗涤沉淀。加 DEPC 水溶解 RNA 并测定其浓度, 使用 cDNA 通过仪器进行 PCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.9 细胞线粒体膜电位检测 细胞造模结束后, 将培养板从培养箱中拿出, 弃去培养液。用 PBS 溶液洗涤 1 次, 每孔加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀。另外把试剂盒中提供的 CCCP 按照说明书比例加入到细胞培养液中, 作为阳性对照组处理 20 min。放入细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min, 孵育结束后用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 最后加入 2 mL 细胞培养液。JC-1 单体在检测时设置发射波长为 530 nm, 激发波长为 490 nm; JC-1 聚合物在检测时设置发射波长为 590 nm, 激发波长为 525 nm。线粒体膜电位的变化以荧光强度比值来表示。

1.2.10 化学发光法检测细胞中的 ATP 含量 把 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释为 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 这几个浓度。按照 6 孔板每孔加入 200 μL 裂解液的比例裂解细胞后收集细胞。按照说明书比例配制 ATP 检测工作液, 每孔加入 100 μL , 室温放置 3~5 min 后在检测孔加上 20 μL 样品或标准品, 用化学发光仪测定数据值。

1.2.11 ELISA 法检测细胞中丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 $\alpha 1$ (PDHA1) 含量 本研究采用双抗体夹心法测定 HPAEC 中丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 $\alpha 1$ (pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, PDHA1) 含量。设置校准品孔、样本稀释孔、空白孔和样本孔, 校准品孔各加不同浓度的校准品 50 μL , 按说明书比例加入样本

稀释液和待测样本。除空白孔外, 每孔加入生物素抗体 100 μL , 用封板膜盖住反应板。接着通过温育、洗涤、加酶、温育、洗涤、显色、终止的步骤操作 (常规条件), 测量各孔的吸光度值并绘制标准曲线计算样品中 PDHA1 含量。

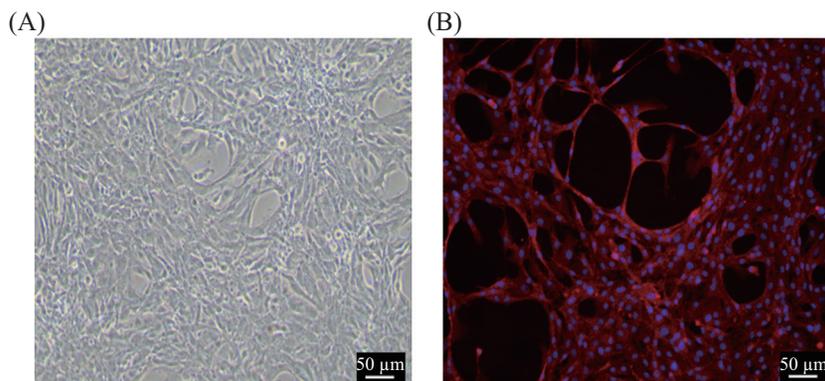
1.2.12 磺基水杨酸法检测细胞中柠檬酸 (citric acid, CA) 含量 铁 (III)-磺基水杨酸生成紫红色络合物, 可被柠檬酸还原褪至橙红色。在一定条件下, 该溶液在特定波长的吸光度 (D) 的下降值与柠檬酸的含量成正比。细胞造模结束后, 每孔加入 500 μL 提取液用细胞刮刀刮取, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min 后取上清液冰上待测。在 96 孔板中依次加入试剂一、试剂二、提取液、待测样本和蒸馏水, 混匀, 室温条件下孵育 20 min, 于 470 nm 处读取吸光度值并计算。

1.2.13 统计学处理 所有统计分析均使用 Graph-Pad Prism 10.3 软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Shapiro Wilk 检验评估数据的正态分布情况, 实验数据不符合正态分布时使用 Kruskal-Wallis H 检验; 当实验数据符合正态分布和方差齐性时, 两组间样本比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 事后检验采用韦尔奇检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人肺动脉内皮细胞的鉴定

人肺动脉内皮细胞在光学显微镜下密度达 90%, 大片融合呈“铺路石样”外观, 用免疫荧光标记法检测内皮细胞的特异性表达标志物之一: CD31。荧光显微镜观察结果显示: 蓝色荧光标记为细胞核;



A: 光学显微镜下图; B: 免疫荧光鉴定图。

A: image under an optical microscope; B: immunofluorescence identification image.

图1 肺动脉内皮细胞鉴定图

Fig.1 Identification of pulmonary artery endothelial cells

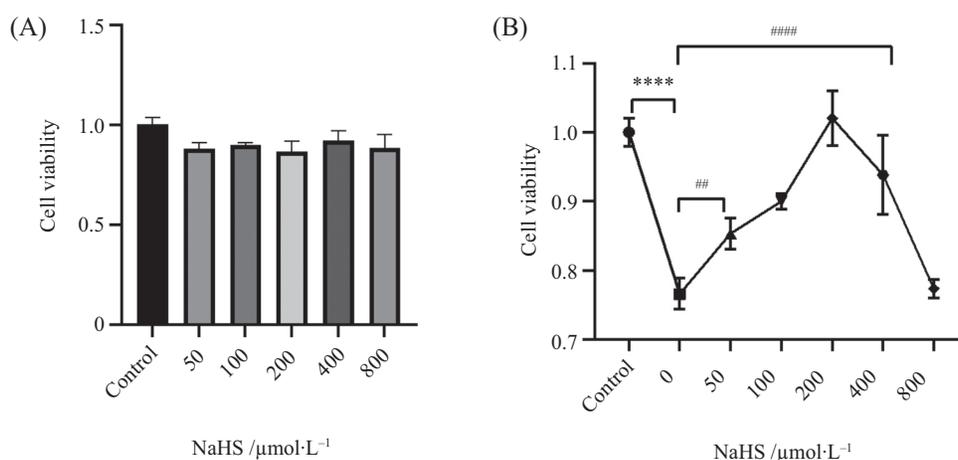
A: CCK-8检测不同浓度NaHS对对照组细胞的影响; B: CCK-8检测不同浓度NaHS在缺氧条件下的作用效果。n=4; **** $P<0.0001$; # $P<0.01$, #### $P<0.0001$ 。A: CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of NaHS on control cells; B: CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of NaHS under hypoxic conditions. n=4; **** $P<0.0001$; # $P<0.01$, #### $P<0.0001$ 。

图2 CCK-8检测NaHS对HPAEC细胞活性的影响

Fig.2 CCK-8 assay for detecting the effect of NaHS on the viability of HPAEC cells

红色荧光标记为CD31蛋白位置,大量表达于HPAEC胞质和细胞间紧密连接处。以此为据,证实本实验细胞为HPAEC(图1A和图1B)。

2.2 CCK-8确认NaHS减轻HPAEC损伤的最佳浓度

实验结果显示,常氧+NaHS条件对细胞活性不产生明显影响($P>0.05$)(图2A)。而在低氧培养条件下,低氧组HPAEC细胞活性明显下降($P<0.0001$),NaHS浓度在200 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著上调低氧处理的HPAEC细胞活性($P<0.0001$)。因此选择200 $\mu\text{mol/L}$ 的NaHS作为治疗浓度进行后续实验(图2B)。

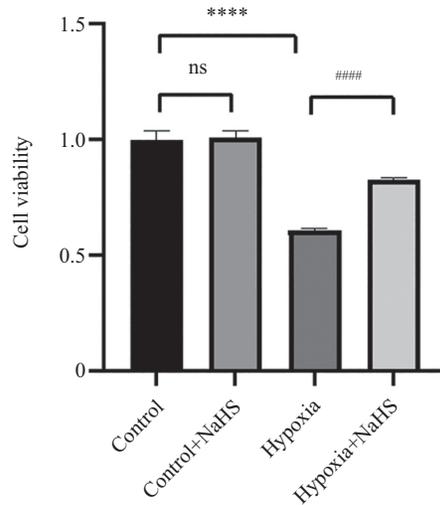
2.3 NaHS对HPAEC活性的影响

与Control组相比,Control+NaHS组的细胞活性

无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,Hypoxia组细胞活力显著降低($P<0.0001$);与Hypoxia组相比,Hypoxia+NaHS组细胞活性明显上升($P<0.0001$)(图3)。这证实Hypoxia可以降低HPAEC细胞活性,引起细胞损伤;而NaHS预处理可减轻Hypoxia引起的HPAEC损伤。

2.4 各组HPAEC中ET-1、NO、 PGI_2 的含量

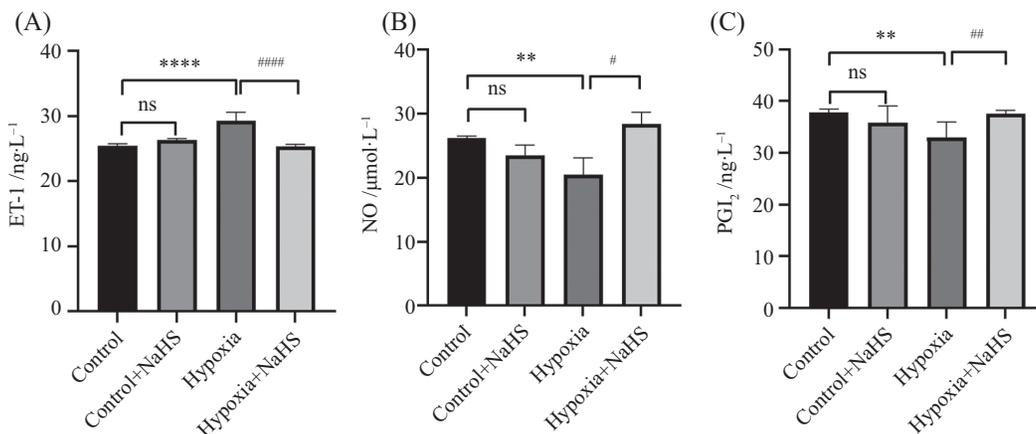
与Control组相比,Control+NaHS组的ET-1、NO、 PGI_2 的浓度均无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,Hypoxia组ET-1的浓度显著升高($P<0.0001$),NO和 PGI_2 的浓度显著降低($P<0.01$);与Hypoxia组相比,Hypoxia+NaHS组ET-1的浓度显著降低($P<0.0001$),



$n=4$; $^{ns}P>0.05$; $^{****}P<0.0001$; $^{####}P<0.0001$.

图3 各组HPAEC细胞活性变化统计图

Fig.3 Statistical plot of changes in HPAEC cell viability in each group



A: ET-1浓度统计图; B: NO浓度统计图; C: PGI₂浓度统计图。 $n=5$; $^{ns}P>0.05$; $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$; $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{####}P<0.0001$ 。

A: statistical chart of ET-1 concentration; B: statistical chart of NO concentration; C: statistical chart of PGI₂ concentration. $n=5$; $^{ns}P>0.05$; $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$; $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{####}P<0.0001$ 。

图4 各组HPAEC细胞ET-1、NO、PGI₂的浓度变化统计图

Fig.4 Statistical chart of concentration changes of ET-1, NO and PGI₂ in HPAEC cell in each group

NO和PGI₂的浓度显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图4A~图4C)。

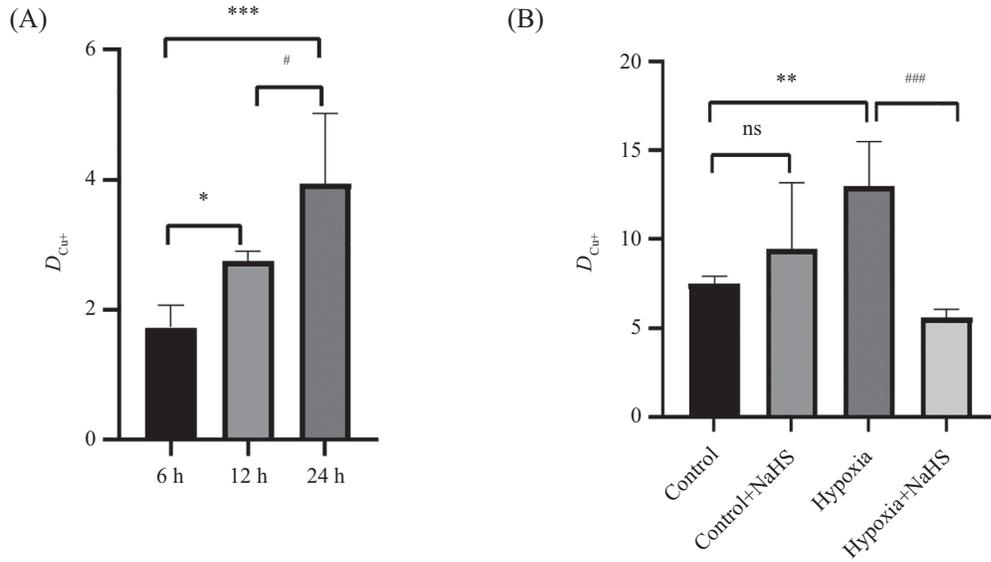
2.5 各组HPAEC中Cu⁺的含量

与Control组相比, Hypoxia组的Cu⁺浓度的变化差值在6 h、12 h、24 h有不同程度的升高($P<0.05$ 或 $P<0.001$)(图5A)。与Control组相比, Control+NaHS组Cu⁺浓度虽稍有升高但其差异并无统计学意义($P>0.05$); 与Control组相比, Hypoxia组的Cu⁺浓度显著升高($P<0.01$); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+NaHS组的Cu⁺浓度明显降低($P<0.001$)(图5B)。实验结果表明, 在细胞低氧模型中Cu⁺浓度升高且有时间依赖

性, 而NaHS处理可降低Cu⁺浓度, 对细胞起到一定的保护作用。

2.6 低氧处理细胞后铜转运蛋白及铜死亡相关蛋白表达情况

Western blot结果显示: 与Control组相比, Hypoxia组的CTR1表达显著上调($P<0.001$), ATP7A、ATP7B表达显著下调($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)(图6A和图6B), 以上结果显示铜离子转运蛋白在细胞低氧条件下发生相应变化, 与铜离子浓度变化趋势一致。与此同时, 与Control组相比, Hypoxia组的FDX1、LIAS、DLAT、DLST表达均显著下调($P<0.001$ 或 $P<0.0001$)且DLAT

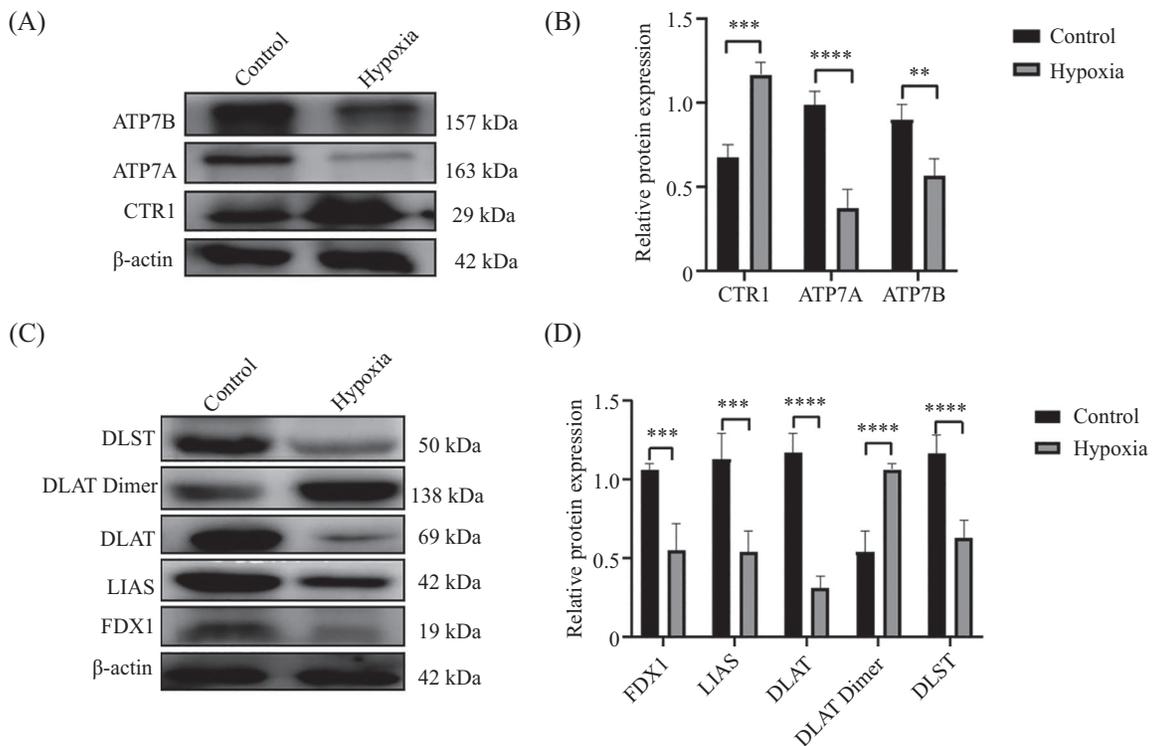


A: 低氧条件下不同时间段的铜离子浓度; $n=5$; $*P<0.05$, $***P<0.001$; $\#P<0.05$; B: 各组细胞中的铜离子浓度。 $n=5$; $^{ns}P>0.05$, $**P<0.01$; $^{###}P<0.001$ 。

A: copper ion concentration at different time periods under hypoxic conditions; $n=5$; $*P<0.05$, $***P<0.001$; $\#P<0.05$; B: Copper ion concentration in each group of cells. $n=5$; $^{ns}P>0.05$, $**P<0.01$; $^{###}P<0.001$ 。

图5 各组细胞中 Cu^{+} 的浓度变化

Fig.5 Changes in Cu^{+} concentration in each group of cells



A、B: 低氧处理后铜转运蛋白的表达变化; C、D: 低氧处理后铜死亡相关蛋白的表达变化。 $n=5$; $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

A,B: expression changes of copper transporters proteins after hypoxia; C,D: expression changes of cuproptosis related proteins after hypoxia. $n=5$; $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

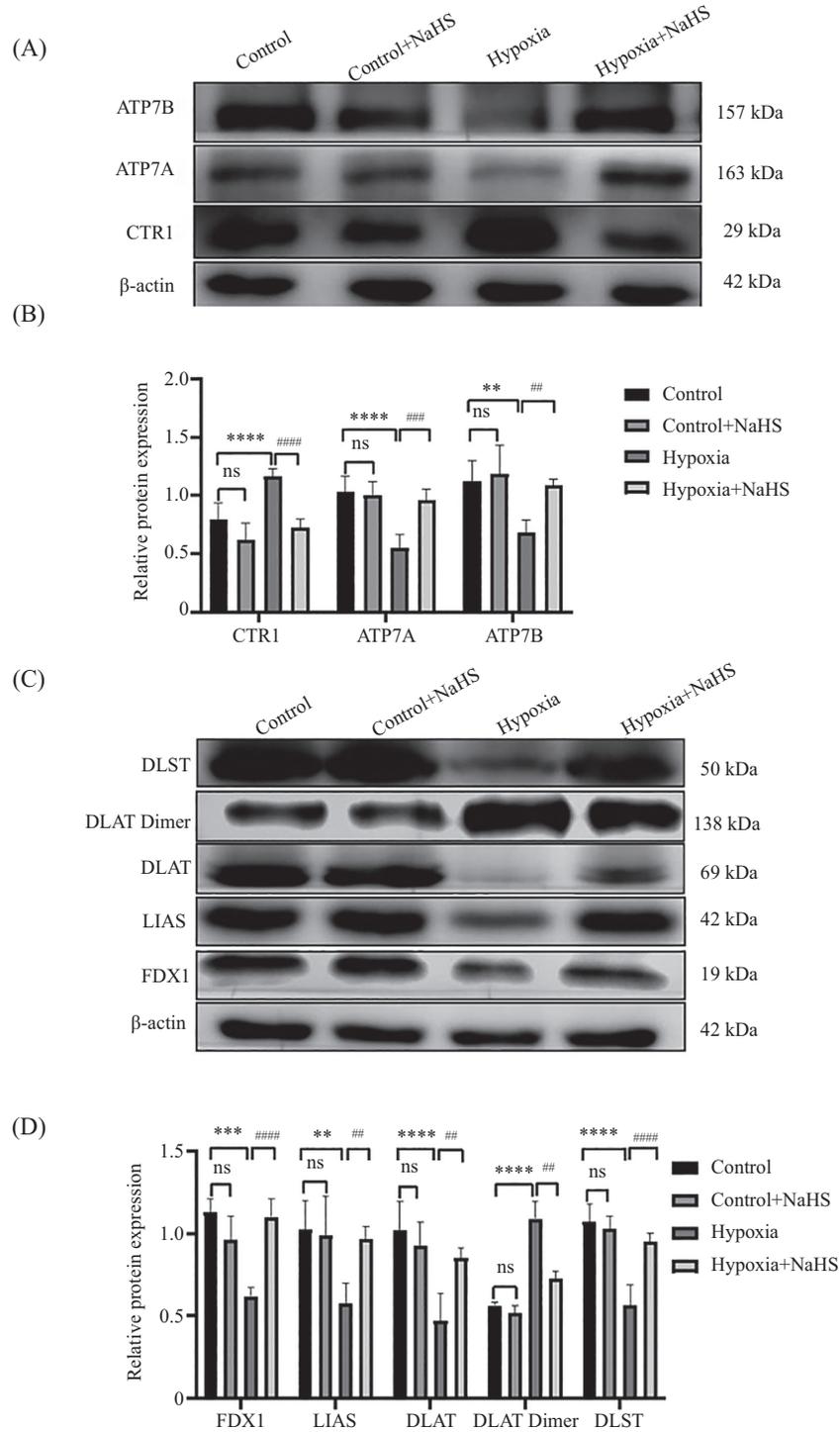
图6 低氧处理细胞后铜转运蛋白以及铜死亡相关蛋白的表达变化

Fig.6 Changes in the expression of copper transporters proteins and cuproptosis related proteins after hypoxia of cells

Dimer表达显著上调($P<0.0001$)(图6C和图6D)。以上结果提示低氧可激活肺动脉内皮细胞的铜死亡。

2.7 各组HPAEC铜转运蛋白及铜死亡相关蛋白表达情况

Western blot结果显示：与Control组相比，



A、B: 各组中铜转运蛋白的表达变化; C、D: 各组中铜死亡相关蛋白的表达变化。 $n=5$; $^{ns}P>0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$; $^{\#}P<0.01$, $^{\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#}P<0.0001$ 。

A,B: expression changes of copper transporters proteins in each group; C,D: expression changes of cuproptosis related proteins in each group. $n=5$; $^{ns}P>0.05$ vs Control group; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$; $^{\#}P<0.01$, $^{\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#}P<0.0001$ 。

图7 各组细胞中铜转运蛋白以及铜死亡相关蛋白的表达变化

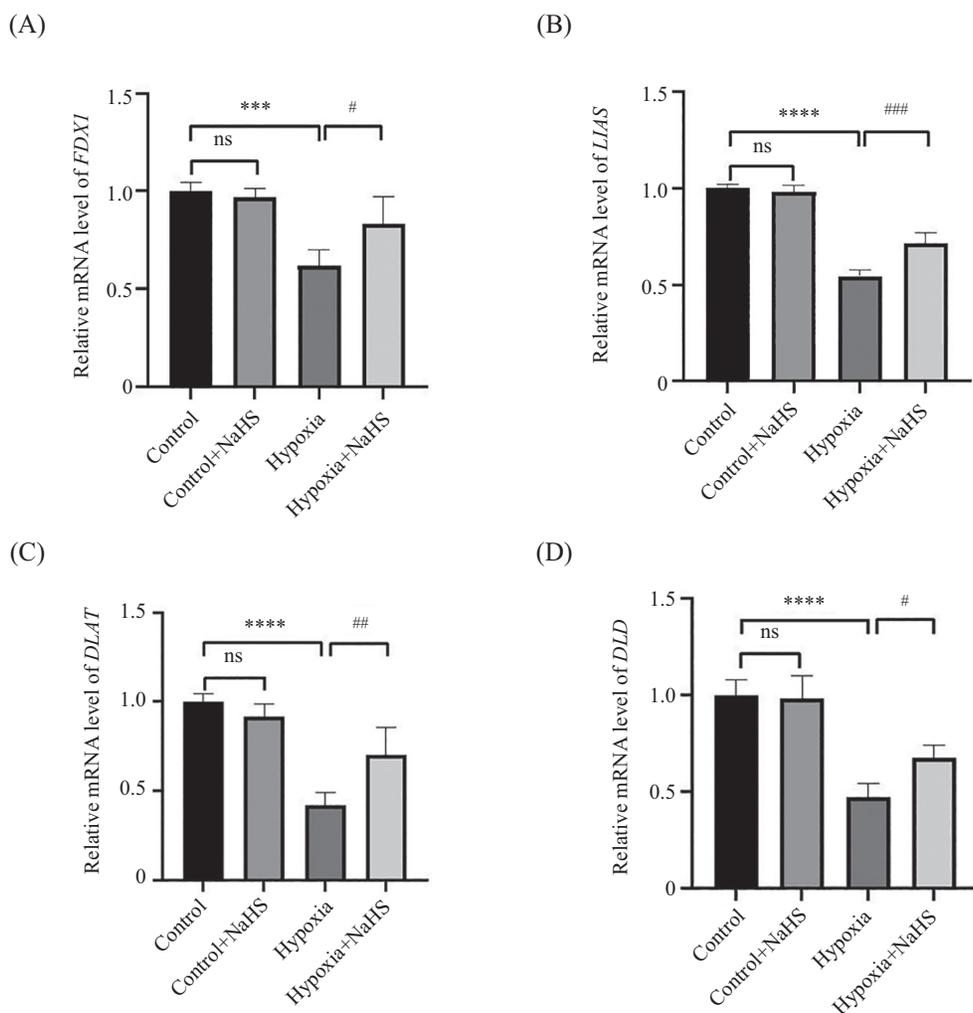
Fig.7 Changes in the expression of copper transporters proteins and cuproptosis related proteins in each group of cells

Control+NaHS组各蛋白表达均无显著变化($P>0.05$); 与Control组相比, Hypoxia组的CTR1表达显著上调($P<0.0001$), ATP7A、ATP7B表达显著下调($P<0.01$ 或 $P<0.0001$); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+NaHS组的CTR1表达显著下调($P<0.0001$), ATP7A、ATP7B表达显著上调($P<0.01$ 或 $P<0.001$)(图7A和图7B), 以上结果显示铜离子转运蛋白在细胞低氧条件下发生相应变化, 加入NaHS可以逆转这一现象。与此同时, 与Control组相比, Hypoxia组的FDX1、LIAS、DLAT、DLST表达均显著下调($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)且DLAT Dimer显著上调($P<0.0001$); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+NaHS组的FDX1、LIAS、DLAT、DLST表达均显著上调($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)且DLAT

Dimer显著下调($P<0.01$)(图7C和图7D)。以上结果显示铜死亡相关蛋白在细胞低氧条件下表达下调, 而NaHS可以逆转这一现象。

2.8 各组HPAEC中FDX1、LIAS、DLAT、DLD基因mRNA表达情况

RT-qPCR结果(图8A~图8D)显示: 与Control组相比, Control+NaHS组各基因表达均无显著变化($P>0.05$); 与Control组相比, Hypoxia组FDX1、LIAS、DLAT、DLD基因水平均有不同程度降低($P<0.001$ 或 $P<0.0001$); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+NaHS组各基因表达水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。以上结果与Western blot结果一致, 表明NaHS可抑制HPAEC中的铜死亡。

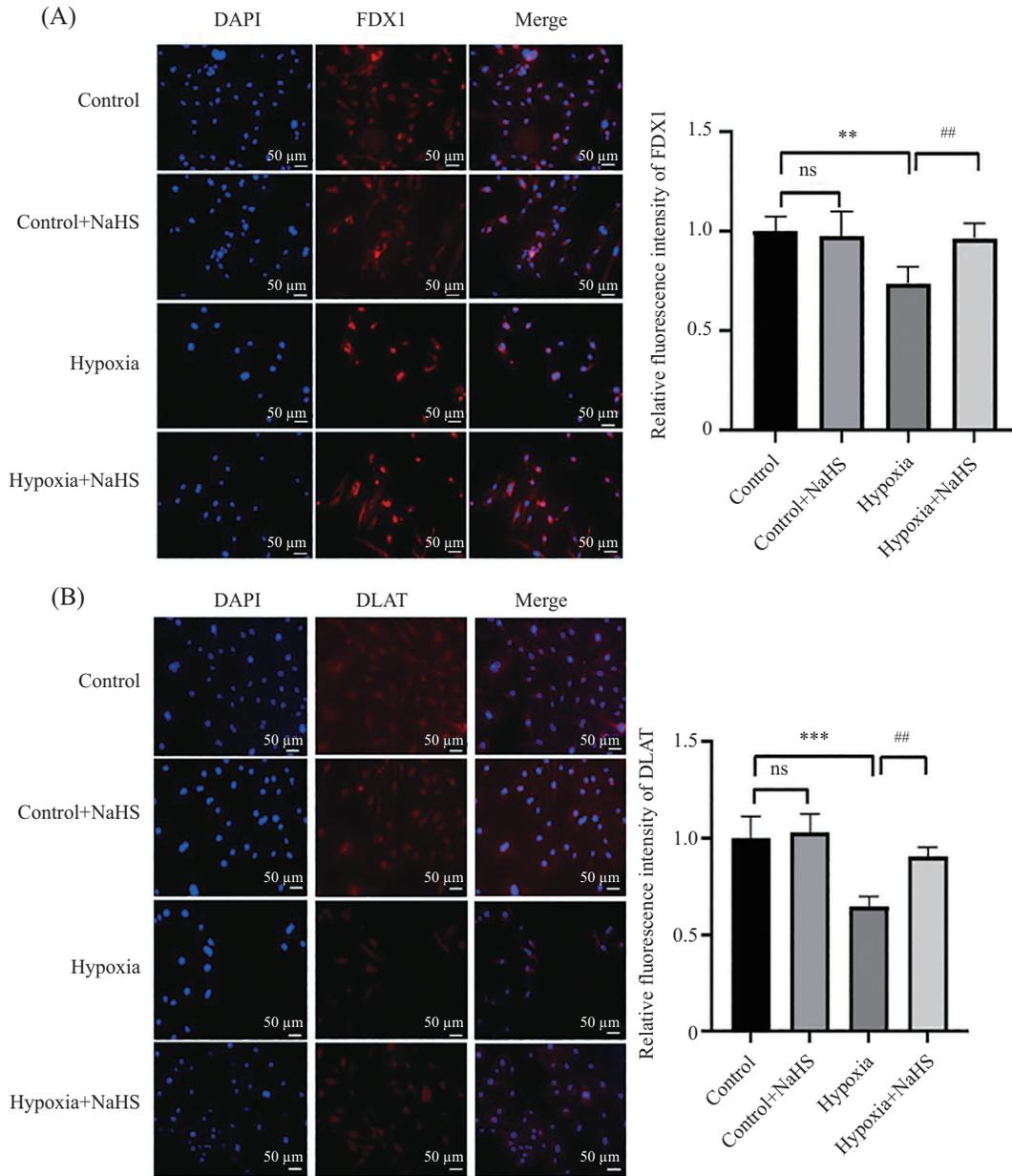


A: *FDX1*的相对mRNA水平; B: *LIAS*的相对mRNA水平; C: *DLAT*的相对mRNA水平; D: *DLD*的相对mRNA水平。n=4; ns $P>0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

A: relative mRNA level of *FDX1*; B: relative mRNA level of *LIAS*; C: relative mRNA level of *DLAT*; D: relative mRNA level of *DLD*. n=4; ns $P>0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

图8 各组细胞中*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD*的mRNA水平

Fig.8 mRNA levels of *FDX1*, *LIAS*, *DLAT*, *DLD* in each group of cells



A: FDX1的相对荧光强度(红); B: DLAT的相对荧光强度(红)。n=4; ^{ns}P>0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001; ^{##}P<0.01。

A: relative fluorescence intensity of FDX1 (red); B: relative fluorescence intensity of DLAT (red). n=4; ^{ns}P>0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001; ^{##}P<0.01.

图9 各组HPAEC中FDX1、DLAT的免疫荧光染色

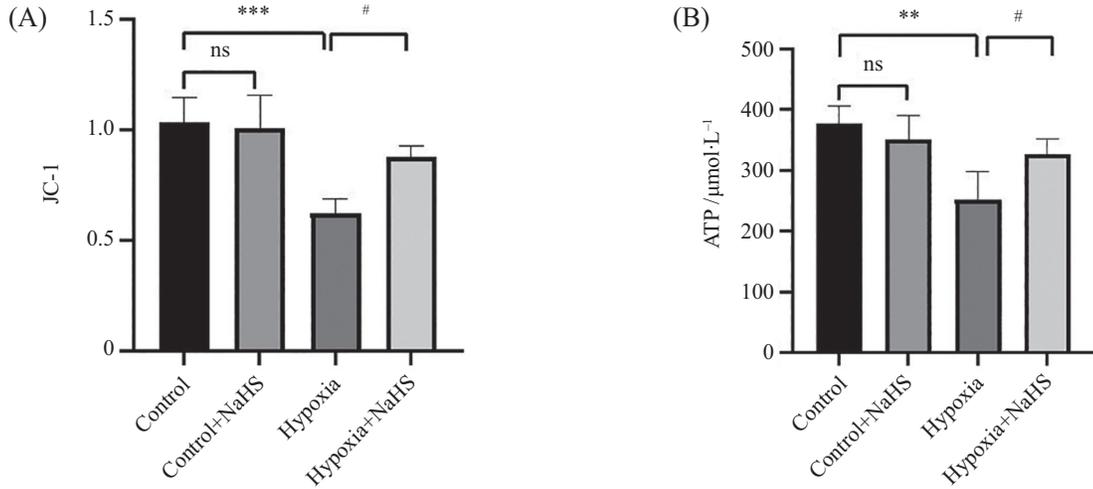
Fig.9 Immunofluorescence staining of FDX1 and DLAT in HPAEC in each group

2.9 各组HPAEC中FDX1、DLAT免疫荧光表达变化

免疫荧光结果(图9A和图9B)显示:与Control组相比,Control+NaHS组红色荧光强度均无显著变化($P>0.05$);与Control组相比,Hypoxia组红色荧光强度降低,FDX1和DLAT蛋白表达均显著下调($P<0.01$ 或 $P<0.001$);与Hypoxia组相比,Hypoxia+NaHS组红色荧光强度升高,FDX1和DLAT蛋白表达均显著上调($P<0.01$)。

2.10 各组HPAEC中JC-1和ATP含量的变化情况

与Control组相比,Control+NaHS组JC-1和ATP含量均无显著变化($P>0.05$);Hypoxia组的JC-1和ATP的含量显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$);与Hypoxia组相比,Hypoxia+NaHS组的JC-1和ATP含量显著升高($P<0.05$)(图10A和图10B)。以上结果表明,低氧组细胞中线粒体功能受损,加入NaHS有一定的改善作用。

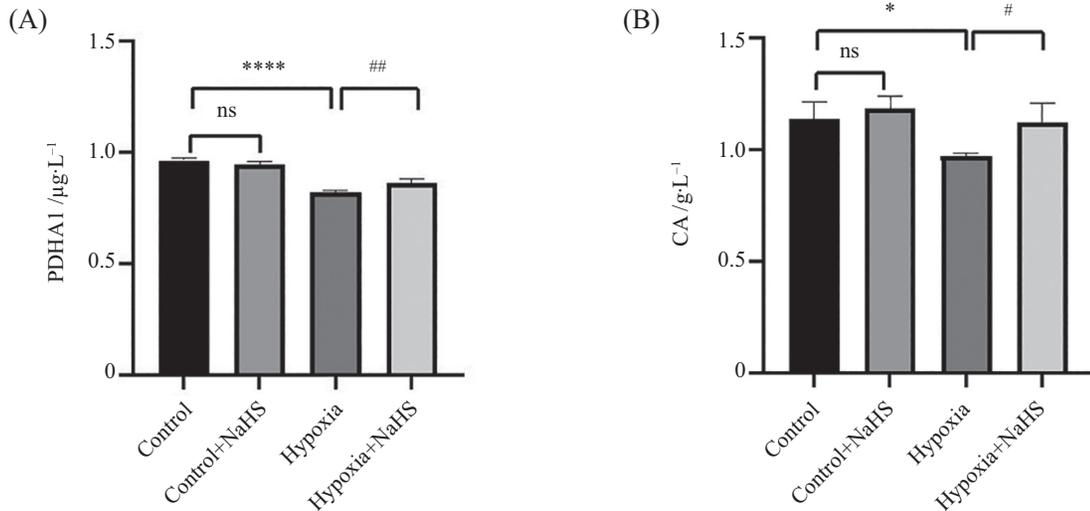


A: JC-1的表达水平; B: ATP的表达水平。n=4; ^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$ 。

A: expression level of JC-1; B: expression level of ATP. n=4; ^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$ 。

图10 各组细胞中JC-1和ATP含量表达水平

Fig.10 Expression levels of JC-1 and ATP concentrations in each group of cells



A: PDHA1的表达水平; B: CA的表达水平。n=4; ^{ns} $P>0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

A: expression level of PDHA1; B: expression level of CA. n=4; ^{ns} $P>0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

图11 各组细胞中PDHA1和CA表达水平

Fig.11 Expression levels of PDHA1 and CA in each group of cells

2.11 各组HPAEC中PDHA1和CA含量的变化

与Control组相比, Control+NaHS组PDHA1和CA浓度均无显著变化($P>0.05$); Hypoxia组的PDHA1和CA浓度显著降低($P<0.0001$ 或 $P<0.05$); 与Hypoxia组相比, Hypoxia+NaHS组的PDHA1和CA浓度显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图11A和图11B)。以上结果表明, 低氧组细胞中与线粒体呼吸有关的三羧酸循环指标发生了明显变化, 而NaHS可以逆转这一现象。

3 讨论

肺动脉高压(PAH)是各种原因导致的肺动脉压力持续升高的一组病理生理综合征。肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cell, PAECs)是单层扁平上皮细胞, 在维持肺血管稳态调控中发挥重要作用, 缺氧是引起PAH的常见原因之一, 可导致PAECs功能障碍。先前课题组多聚焦于研究缺氧条件下肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)异常增殖引起的肺血管重建

的分子机制,但该机制在肺动脉内皮细胞中的精准调控作用尚不明确。为此,本实验建立低氧人肺动脉内皮细胞损伤模型探讨潜在机制。内皮素-1(ET-1)是内皮细胞生成的一种生物肽,ET-1通过与ET-1受体结合发挥作用,而肺血管内皮细胞中大量表达内皮素受体B(endothelin receptor B, ETB), ET-1可激活ETB诱导内皮细胞释放血管舒张因子如NO和PGI₂,在肺动脉高压疾病过程中起保护作用^[15]。一旦PAECs发生损伤,内皮血管活性介质释放可诱导肺血管收缩,使肺动脉阻力升高^[16-17]。本实验研究发现与Control组相比,Hypoxia组细胞活力显著下降,内皮源性血管收缩因子ET-1的浓度显著升高而内皮源性血管舒张因子NO和PGI₂的浓度显著降低,使用外源性H₂S——NaHS(200 μmol/L)预处理后细胞活力显著上升,ET-1的浓度明显下降,而NO和PGI₂的浓度明显升高,表明NaHS可有效改善Hypoxia诱导的内皮细胞损伤,逆转血管活性介质的变化。

早在20世纪80年代,研究人员就在7名原发性肺动脉高压患者和6名正常女性中测量了血清铜水平发现肺动脉高压患者的平均血清铜水平显著较高,血清铜的升高可能是PAH的原因或标志^[18]。研究表明在PAH的发生发展中伴随着铜离子的增多^[19],铜诱导的活性氧产生可导致蛋白质修饰和线粒体功能障碍,可介导多种类型的细胞死亡。铜死亡是一种新型的细胞死亡方式,其机制关键在于细胞内铜超载,也与能量代谢和线粒体功能密切相关^[20]。有研究发现高脂膳食模型小鼠中肝脏组织中铜死亡指标铁氧化还原蛋白1(FDX1)和二氢硫辛酸转乙酰基酶(DLAT)表达随着铜浓度的升高而有所改变^[21];也有学者通过加权相关网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)初步筛选出3个PAH相关铜死亡基因(包括LIAS)^[22]。因此我们猜测,铜死亡可能参与了PAH的发生发展,但详细调控机制未明。铜转运蛋白1(CTR1)位于肠黏膜细胞的刷状缘顶膜一侧,是介导摄取的铜离子跨膜转运至细胞内的重要载体,铜转运ATP酶α(ATP7A)和ATP7B通过N-端的磷酸化结构域与质膜结合,将铜离子从细胞质内部带入线粒体,是铜在线粒体内部转运的主要调节因子^[23]。本实验结果发现与Control组相比,Hypoxia组细胞内Cu⁺浓度明显升高且有一定的时间依赖性,CTR1蛋白含量显著增高,铜转出相关蛋白ATP7A和ATP7B含量显著降低,用NaHS治疗后出现相反的趋

势。结果表明低氧诱导的内皮细胞损伤模型中存在铜代谢稳态失衡,NaHS可调控铜离子浓度且对内皮细胞有一定的保护作用。

蛋白硫辛酰化是蛋白质脂酰化的一种,DLAT和DLST的作用发挥依赖于硫辛酰化修饰的完成,而LIAS催化从头途径合成硫辛酸的最后一步^[24],其减少会严重影响蛋白质的硫辛酰化过程。研究已经证明FDX1和LIAS是铜死亡的上游调控因子^[4],铜过量与硫辛酰化蛋白结合导致这些蛋白的聚集,进而干扰线粒体功能而导致细胞死亡。Western blot实验结果表明,与Control组相比,Hypoxia组与铜死亡相关的蛋白FDX1、LIAS、DLAT、DLST表达均显著下调且DLAT二聚体表达显著上调;RT-qPCR实验表明,Hypoxia组FDX1、LIAS、DLAT、DLST基因表达水平均有不同程度降低;免疫荧光实验表明,Hypoxia组FDX1和DLAT蛋白表达显著下调,以上结果提示缺氧引起内皮细胞损伤过程中铜死亡相关指标发生相应的变化,而使用NaHS治疗后出现相反的趋势。结果表明,外源性H₂S可改善缺氧引起的HPAEC损伤,其机制可能与降低铜浓度,减轻细胞铜死亡有关。

线粒体是双层膜包被,即线粒体外膜(outermitochondrial membrane, OMM)和线粒体内膜(innermitochondrial membrane, IMM)的细胞器。线粒体包含氧化磷酸化和糖酵解2种能量代谢途径。糖酵解的最终产物之一丙酮酸通过IMM上的丙酮酸载体转运至线粒体基质中,并在丙酮酸脱氢酶的作用下转化为乙酰辅酶A(acetyl coenzyme A, acetyl-CoA)并进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)。FDX1是一种线粒体还原酶,通过其在电子转移中的作用被确定为铜转化途径的关键参与者,研究已经证明了在FDX1缺失的细胞中,三羧酸循环可被抑制^[4]。硫辛酰对多种α-酮酸脱氢酶(丙酮酸脱氢酶、酮戊二酸脱氢酶、支链α-酮酸脱氢酶和酮己二酸脱氢酶)的功能至关重要,参与了线粒体代谢的多个方面的基本功能^[25]。H₂S已被报道在低水平下可促进线粒体电子传递并提升细胞生物能量水平^[26],且H₂S相关生物技术可诱导线粒体重编程,进而对铜死亡产生影响^[27]。本实验结果显示,与Control组相比,Hypoxia组线粒体功能指标JC-1和ATP的含量显著降低,三羧酸循环指标PDHA1和CA的浓度显著降低,用NaHS治疗后出现相反的趋势。国内外研究

中有关H₂S调控血管张力的机制包括H₂S能通过抑制核因子-κB(nuclear factor-kappa-B, NF-κB)信号通路减轻肺动脉内皮炎症来缓解PAH^[28]; H₂S通过对骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)及其下游信号分子的抑制来缓解过量的内皮依赖性收缩^[29]。本文研究结果提示外源性H₂S减轻HPAEC损伤的机制可能与调控铜代谢稳态降低铜浓度,改善细胞线粒体功能、代谢有关,其铜死亡通路可能是不同于以往研究的新机制。

综上所述,缺氧可激活内皮细胞中铜死亡相关蛋白的表达,引发肺动脉内皮细胞功能、代谢受损;NaHS对缺氧引起的HPAEC功能、代谢紊乱有一定的改善作用,其机制可能是通过降低铜离子浓度抑制铜死亡,进而影响线粒体相关的三羧酸循环进程。

参考文献 (References)

- TEICHERT K K, KUTRYK M B, KULISZEWSKI M A, et al. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2006, 98(2): 209-17.
- MCLAUGHLIN V V, MCGOON M D. Pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2006, 114(13): 1417-31.
- MAUNG M T, CARLSON A, OLEA F M, et al. The molecular and cellular basis of copper dysregulation and its relationship with human pathologies [J]. *FASEB J*, 2021, 35(9): e21810.
- TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-61.
- ROWLAND E A, SNOWDEN C K, CRISTEA I M. Protein lipoylation: an evolutionarily conserved metabolic regulator of health and disease [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 42: 76-85.
- SUDHAHAR V, DAS A, HORIMATSU T, et al. Copper transporter ATP7A (copper-transporting P-type ATPase/menkes ATPase) limits vascular inflammation and aortic aneurysm development: role of microRNA-125b [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(11): 2320-37.
- KOKSAL C, ERCAN M, BOZKURT A K, et al. Abdominal aortic aneurysm or aortic occlusive disease: role of trace element imbalance [J]. *Angiology*, 2007, 58(2): 191-5.
- GUO Z, LI C S, WANG C M, et al. CSE/H₂S system protects mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation induced apoptosis via mitochondrial injury, endoplasmic reticulum stress and PI3K/Akt activation pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2128-34.
- AN Y, ZHOU Y, ZHANG L, et al. Human serum albumin-derived biosensor for visualizing copper (II) and hydrogen sulfide interactions in cancer cells [J]. *J Adv Res*, 2025, 40: 1220-32.
- WU D D, JIN S, CHENG R X, et al. Hydrogen sulfide functions as a micro-modulator bound at the copper active site of Cu/Zn-SOD to regulate the catalytic activity of the enzyme [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(7): 112750.
- YANG L, PENG Z, GONG F, et al. TRPC4 aggravates hypoxic pulmonary hypertension by promoting pulmonary endothelial cell apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 219: 141-52.
- LEI W, CHEN M, HUANG Z, et al. Salsidroside protects pulmonary artery endothelial cells against hypoxia-induced apoptosis via the AhR/NF-κB and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155376.
- HEDEGAARD E R, GOULIAEV A, WINTHER A K, et al. Involvement of potassium channels and calcium-independent mechanisms in hydrogen sulfide-induced relaxation of rat mesenteric small arteries [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(1): 53-63.
- CONNOLLY M J, PRIETO L J, BECKER S, et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the absence of pretone: essential role for intracellular Ca²⁺ release [J]. *The Journal of physiology*, 2013, 591(18): 4473-98.
- BARETELLA O, VANHOUTTE P M. Endothelium-dependent contractions: prostacyclin and endothelin-1, partners in crime [J]? *Adv Pharmacol*, 2016, 77: 177-208.
- CHAI T, QIU C, XIAN Z, et al. A narrative review of research advances in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(4): 230.
- CHEN J, ZHANG M, LIU Y, et al. Histone lactylation driven by mROS-mediated glycolytic shift promotes hypoxic pulmonary hypertension [J]. *J Mol Cell Biol*, 2022, 14(12): mjac073.
- AHMED T, SACKNER M A. Increased serum copper in primary pulmonary hypertension: a possible pathogenic link [J]? *Respiration*, 1985, 47(4): 243-6.
- SILVA D A, DE L A, SQUITTI R, et al. Copper in tumors and the use of copper-based compounds in cancer treatment [J]. *J Inorg Biochem*, 2022, 226: 111634.
- PERIASAMY V S, RIYASDEEN A, RAJENDIRAN V, et al. Induction of redox-mediated cell death in ER-positive and ER-negative breast cancer cells by a copper (II)-phenolate complex: an *in vitro* and *in silico* study [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4504.
- NASIRMAHALLEH N M, HEMMATI M, PARSAMANESH N, et al. Modulation of cuproptosis pathway genes (DLAT, FDX1) and antioxidant enzyme activities in obese mice in response to quercetin and calorie restriction [J]. *DNA Cell Biol*, 2025, 44(7): 370-9.
- 王岩岩, 苏远. 肺动脉高压与铜死亡相关标记基因和免疫特征的分析研究 [J]. *巴楚医学* (WANG Y Y, SU Y. Analysis of pulmonary hypertension in relation to cuproptosis-associated marker genes and immune characteristics [J]. *Bachu Medical*, 2023, 6(2): 31-8.
- JIANG Y, HUO Z, QI X, et al. Copper-induced tumor cell death mechanisms and antitumor therapeutic applications of copper complexes [J]. *Nanomedicine*, 2022, 17(5): 303-24.
- ROWLAND E A, SNOWDEN C K, CRISTEA I M. Protein lipoylation: an evolutionarily conserved metabolic regulator of health and disease [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 42: 76-85.
- MARTINS N R, ACKET S, TRONCOSO-PONCE M A, et al. Characterization of *Helianthus annuus* lipoyl acid biosynthesis: the mitochondrial octanoyltransferase and lipoyl synthase en-

- zyme system [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 781917.
- [26] MÓDIS K, COLETTA C, ERDÉLYI K, et al. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics [J]. *FASEB J*, 2013, 27(2): 601-11.
- [27] QIAO L, OU Y, LI L, et al. H₂S-driven chemotherapy and mild photothermal therapy induced mitochondrial reprogramming to promote cuproptosis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 205.
- [28] FENG S, CHEN S, YU W, et al. H₂S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(3): 268-78.
- [29] XIAO L, DONG J H, JIN S, et al. Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction via downregulating BMP4/COX-2 pathway in rats with hypertension [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(1): 8128957.