

血浆代谢物丙酮酸影响血管平滑肌细胞凋亡的研究

迪里夏提·斯提, 阿斯亚·阿不得斯木, 吕 慧, 马 翔*

新疆医科大学第一附属医院, 心脏中心, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年6月25日; 录用日期: 2024年7月19日; 发布日期: 2024年7月26日

摘 要

目的: 旨在探索血浆代谢物丙酮酸对血管平滑肌细胞的凋亡作用。方法: 选取人血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC), 用血管紧张素II (Angiotensin II, Ang II) 干预刺激细胞建立VSMC损伤模型, 用不同浓度的特异性代谢物丙酮酸干预损伤细胞, 再通过CCK8、TUNEL及流式等实验检测细胞凋亡情况。结果: VSMC细胞活力以Ang II浓度梯度依赖性降低。不同浓度的丙酮酸对VSMC细胞活力的影响不同, 并在一定的浓度范围内丙酮酸对细胞活力的影响没有统计学差异。Ang II诱导的VSMC受损细胞模型中用丙酮酸干预之后呈现细胞活力恢复趋势。当丙酮酸(2 mmol/L)干预Ang II诱导的VSMC受损细胞模型时可以在一定程度上恢复细胞凋亡。结论: 丙酮酸恢复Ang II干预损伤的血管平滑肌细胞活力。丙酮酸抑制Ang II干预的血管平滑肌细胞进一步凋亡。

关键词

Stanford B型主动脉夹层, 丙酮酸, 血管平滑肌细胞, 凋亡

A Study on the Effect of Plasma Metabolite Pyruvate on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells

Dilixiati Siti, Asiya Abudesimu, Hui Lv, Xiang Ma*

Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: Jun. 25th, 2024; accepted: Jul. 19th, 2024; published: Jul. 26th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 迪里夏提·斯提, 阿斯亚·阿不得斯木, 吕慧, 马翔. 血浆代谢物丙酮酸影响血管平滑肌细胞凋亡的研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(7): 1343-1349. DOI: 10.12677/acm.2024.1472153

Abstract

Objective: To explore the apoptotic effect of plasma metabolite pyruvate on vascular smooth muscle cells. **Method:** Selecting human vascular smooth muscle cells (VSMCs), using angiotensin II (Ang II) intervention to stimulate cells to establish a VSMC injury model. Different concentrations of specific metabolite pyruvate were used to intervene in the damaged cells, and cell apoptosis was detected through CCK8, TUNEL, and flow cytometry experiments. **Results:** The viability of VSMC cells decreased in a gradient dependent manner with Ang II concentration. The effects of different concentrations of pyruvate on VSMC cell viability vary, and there is no statistically significant difference in the effect of pyruvate on cell viability within a certain concentration range. The Ang II induced VSMC damaged cell model showed a trend of cell viability recovery after intervention with pyruvate. When pyruvate (2 mmol/L) intervenes in Ang II induced VSMC damaged cell model, it can partially restore cell apoptosis. **Conclusions:** Acetate restores the vitality of vascular smooth muscle cells after Ang II intervention injury. Acetate inhibits further apoptosis of vascular smooth muscle cells intervened by Ang II.

Keywords

Stanford B Aortic Dissection, Pyruvate, Vascular Smooth Muscle Cell, Apoptosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

主动脉夹层是常见的危及生命的疾病[1]。不幸的是，没有特异性的预测诊断工具以及用于临床实践的药物可预防 AD 进展。因此，仍需要研究其发病机制及潜在治疗方法。以马凡综合征为代表的 AD 属于遗传性疾病[2]，而自发性发病的则属于散发性，且具有年龄、性别、吸烟[3] [4]、高血压及血脂紊乱等特征。遗传与散发型 AD 共有病理特点，表现为 VSMCs 损伤丢失，弹性纤维破坏，炎症因子分泌增多，最终引起主动脉壁弱化，主动脉扩张，夹层破裂。了解主动脉变性的分子机制，包括细胞凋亡途径在这一过程中的潜在作用，为预防治疗方面奠定一定的理论基础。

有研究使用非靶向代谢组学和质谱法分别测定发现血浆代谢物琥珀酸在主动脉夹层与主动脉瘤组中升高，可以作为生物标志物，及潜在治疗靶点[5]。另外一项研究表明 TMAO 可以作为 AD 的辅助诊断生物标志物[6]。其他研究显示鞘氨醇、植物鞘氨醇和神经酰胺在 Stanford A 型与 Stanford B 型 AD 中含量差异有统计学意义，可以作为生物标志物区分 A 与 B 型 AD [7]。既往研究中，丙酮酸是体内产生的三碳酮酸，它是糖酵解途径的最终产物，丙酮酸在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用[8]，有抗氧化作用[9]。在本研究中我们选取人血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)，用血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II)干预刺激细胞建立 VSMC 损伤模型，用不同浓度的特异性代谢物丙酮酸干预损伤细胞，再通过 CCK8、TUNEL 及流式等实验检测细胞凋亡情况。旨在探索血浆代谢物丙酮酸对血管平滑肌细胞的凋亡作用。

2. 实验方法

2.1. 细胞培养

人血管平滑肌细胞(VSMC)置于 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、双抗)，在条件为 37℃、5% CO₂

恒温箱中常规培养。胰酶消化、传代，采用 3~8 代细胞进行实验。

2.2. 检测细胞增殖及活力实验

利用细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK8) (上海碧云天生物技术公司)对 VSMCs 的增殖和活性进行评价。操作如下：先将对数增长的细胞均匀的铺到 96 孔板中，置于 37 度恒温培养箱培养。当细胞完全贴壁，且成对数增长状态时用不同浓度的 Ang II 和丙酮酸(Pyruvic Acid, PA)处理细胞。24 小时后，加入 CCK-8 溶液，37℃避光孵育 1 小时 30 分钟。再用酶标仪测量吸光度，计算细胞增殖能力。

2.3. TUNEL 检测平滑肌细胞细胞凋亡

利用细胞凋亡试剂盒(TdT mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL) (上海碧云天生物技术公司)对 VSMCs 凋亡进行检测评估。操作如下：将对数增长的细胞均匀铺于 24 孔板中，贴壁良好后用 PA 处理，清洗细胞后用 4%多聚甲醛固定细胞 30 分钟，清洗一次。然后加入含有 0.3% TritonX-100 的 PBS，在室温下孵育 5 min。再将 50 μ l TUNEL 测定溶液加入到样本中，避光于 37℃下培养 60 min，封片，在荧光显微镜下进行观测。

2.4. 流式检测平滑肌细胞凋亡

利用 PE Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD Pharmingen 公司)对 VSMCs 凋亡进行进一步检测评估。操作如下：对数增长的细胞均匀的铺到 6 孔板中，用 PA 处理，增殖到足够浓度后移到 15 毫升离心管中以 1600 转/分离心 4 分钟然后去除上清液。再加冷的 PBS，离心去掉上清液，此过程重复 2 遍。用 100 μ l 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞，在显微镜下进行计数。各离心管内样品的数量到达 10^6 个单位/毫升。取上述 100 μ l 液体加到 15 ml 离心管底部。双染管中避光添加 5 μ l PE + 5 μ l 7-ADD (单染管与双染管类似，只是分别分开添加 PE、7-ADD 各 5 μ l)，轻轻吹打，静置 15 min。每一个离心管中加 400 μ l 1 $\times$ 结合缓冲液，再用滤网过滤液体到 5 ml 流式管中。1 小时内上流式分析仪进行检测分析。结果用 FlowJo_V10 统计学处理。

2.5. 统计方法

将所得资料以均值 $\pm$ 标准差表达，以独立样本 t 检验进行组间对比，多组之间进行 ANOVA 分析，以 $P < 0.05$ 为显著性。本研究使用 Graph Pad Prism 9 及 SPSS27.0 对上述资料进行处理。

3. 结果

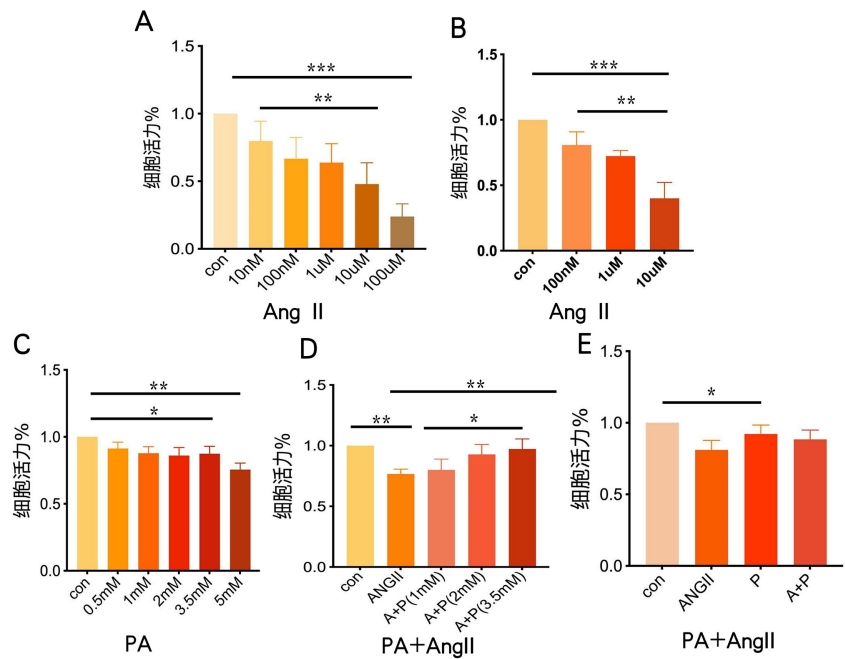
3.1. 丙酮酸对细胞活力的影响

为了在细胞水平阐明丙酮酸对主动脉夹层的影响机制，我们模拟体内丙酮酸作用于主动脉平滑肌，而培养了人主动脉平滑肌细胞(HVSCM)。我们先用不同浓度(10 nmol/L、100 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L、100 μ mol/L)的血管紧张素 II (Ang II)干预已经贴壁良好的细胞，24 小时后，试图得到一个既能导致细胞活力下降且不至于导致细胞大量死亡的一个状态。我们再用不同浓度(0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、3.5 mmol/L、5 mmol/L)的丙酮酸(PA)干预贴壁良好的细胞 24 小时。以上 2 种化合物干预之后均用 CCK8 试剂盒检测细胞活力，其结果如下图(图 1)，随着 Ang II 干预浓度增加细胞活力下降，当 Ang II 浓度为 1 μ M 时细胞活力下降，但也有一部分细胞活力正常。丙酮酸在一定的浓度范围内对血管平滑肌细胞活力影响很小。Ang II 干预血管平滑肌细胞后以不同浓度丙酮酸干预发现：丙酮酸浓度为 2 mM 可以恢复 Ang II 抑制细胞活力。

3.2. TUNEL 试剂盒检测丙酮酸对细胞凋亡的影响

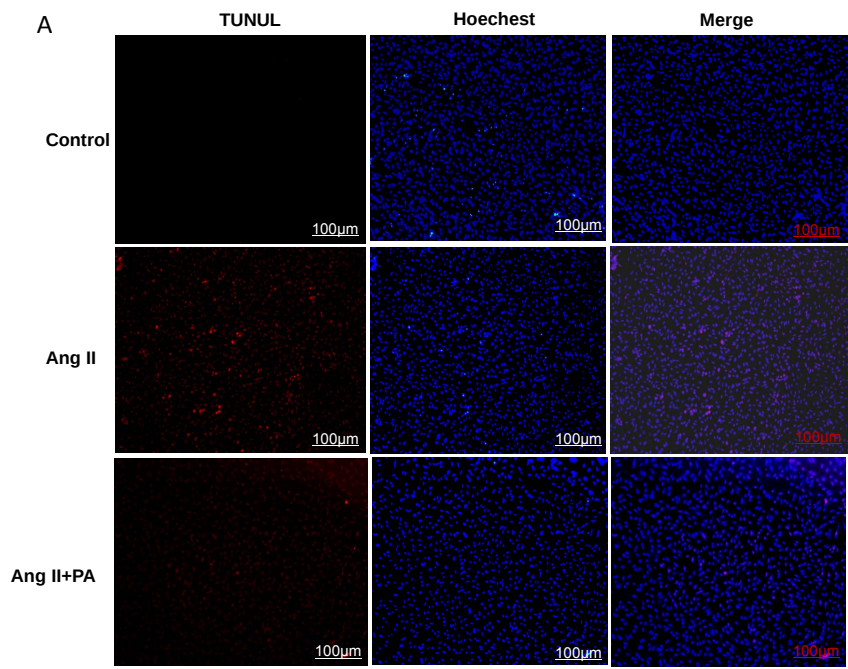
通过 TUNEL 试剂盒处理后得到染成红色荧光的凋亡细胞，阴性对照为蓝色荧光是 DAPI 所染的细胞

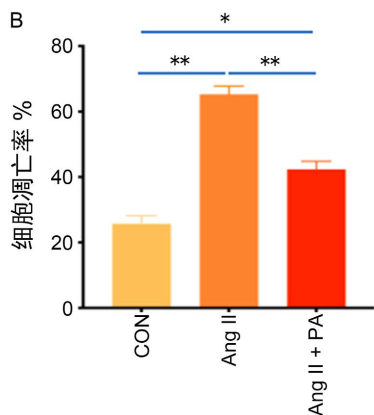
核。阴性对照 control 组细胞状态良好，呈正常的梭形，背景清晰。Ang II 处理的细胞出现了较多的凋亡细胞，呈现萎缩变圆，细胞失去了正常形态。而 Ang II 与 PA 同时处理细胞时，也出现凋亡细胞，但是数目较 Ang II 单独处理少(图 2)。



A: Ang II 5 种浓度干预细胞; B: Ang II 浓度范围缩小为 3 种干预细胞，最终采用浓度 1 uM; C: PA 5 种浓度干预细胞; D: PA 浓度范围缩小为 3 种，且与 1 uM Ang II 同时干预; E: 1 uM Ang II 与 2 mM PA 同时干预细胞。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

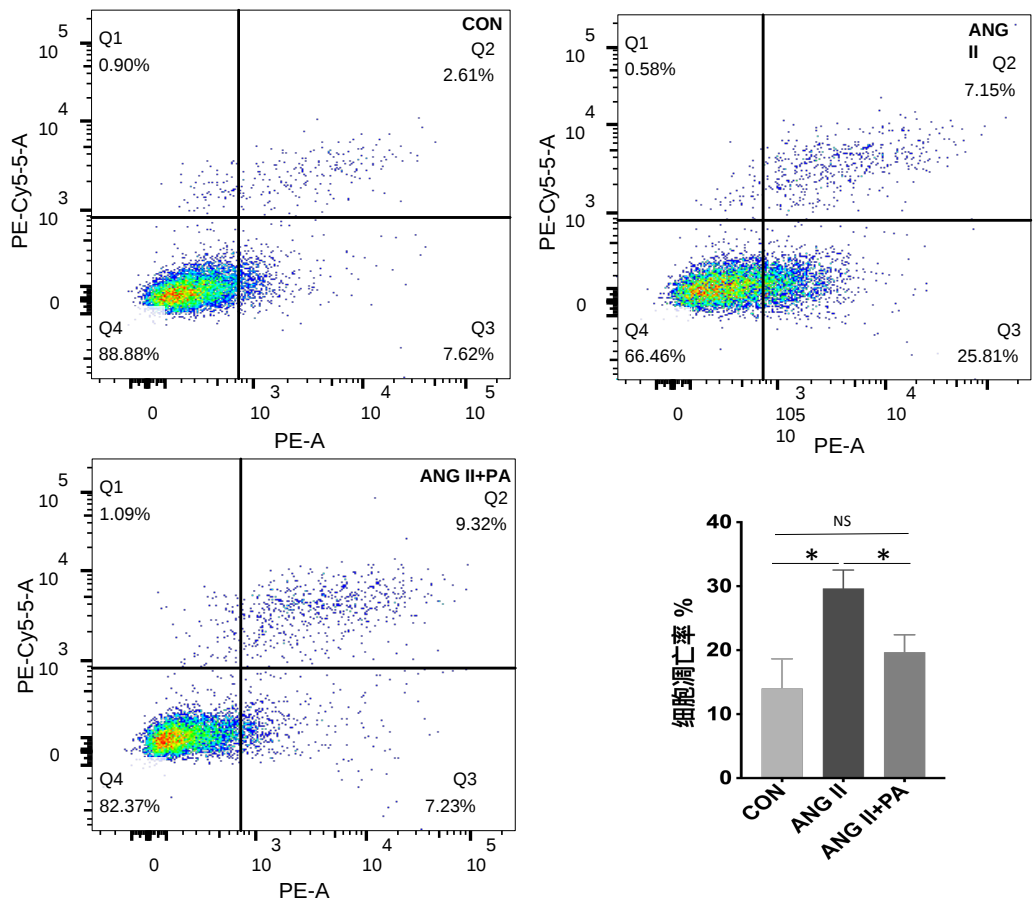
Figure 1. Histogram of CCK8 test results
图 1. CCK8 检测结果柱状图





A: TUNEL 法检测不同处理组, VSMC 细胞凋亡荧光显微镜图片; B: 不同处理组 VSMC 细胞凋亡数分析柱状图(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

Figure 2. TUNEL detection of cell apoptosis
图 2. TUNEL 检测细胞凋亡



Q1: (AnnexinV-FITC)-/PI+, 此区域的细胞为坏死细胞。也可能有少数的晚期凋亡细胞在其中, 甚至机械损伤的细胞也包含其中; Q2: (AnnexinV-FITC)+/PI+, 此区域的细胞为晚期凋亡细胞; Q3: (AnnexinV-FITC)+/PI-, 此区域的细胞为早期凋亡细胞; Q4: (AnnexinV-FITC)-/PI-, 此区域的细胞为活细胞(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

Figure 3. Flow cytometry detection of cell apoptosis
图 3. 流式分析仪检测细胞凋亡

3.3. 流式分析仪检测丙酮酸对细胞凋亡的影响

为了进一步明确丙酮酸对细胞凋亡的影响,我们分别设立空白对照组、Ang II 组及 Ang II + PA 组,用流式分析仪检测细胞凋亡情况。结果如图 3。得出,与对照组相比 Ang II 组平滑肌细胞凋亡率(%)增加(14.03 ± 0.05 vs 29.67 ± 0.03 , $P = 0.002$)。Ang II + PA 与 Ang II 组相比,细胞凋亡率(%)减少(29.67 ± 0.03 vs 19.69 ± 0.08 , $P = 0.013$)。这些结果提示丙酮酸抑制平滑肌细胞凋亡。

4. 讨论

主动脉夹层其发生机理与遗传因素、血液动力学和分子生物学,以及免疫炎症等多方面共同作用。病理变化过程主要有血栓形成、细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的降解、免疫炎症反应、VSMC 凋亡及表型转换出现异常等[10]-[12]。

细胞凋亡已被提出参与 AD 发生发展过程中应激诱导的 SMC 损伤[13]。我们的研究发现不同浓度的 PA 对细胞活力的影响不同,PA 干预受损细胞之后,细胞呈现活力恢复趋势。丙酮酸(2 mmol/L)干预受损细胞模型,可以在一定程度上恢复细胞凋亡。

PA 是一种重要的有机小分子,也是一种很弱的有机酸。PA 既具有羧酸和酮的性质,又具有 α -酮酸的性质。PA 是最简单的 α -酮酸,属于羧基酸。PA 也是体内产生的三碳酮酸,它是糖酵解途径的最终产物,在细胞浆中还原成乳酸供能,或进入线粒体内氧化生成乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环,被氧化成二氧化碳和水,完成葡萄糖的有氧氧化供能过程。因此,PA 是糖代谢中具有关键作用的中间产物。PA 可通过乙酰辅酶 A 和三羧酸循环实现体内糖、脂肪和氨基酸间的互相转化,因此,PA 在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用[8] [9]。PA 除了在三大营养物质代谢方面起重要作用外,在抗氧化方面也起着关键作用[9]。

在本研究中我们应用 Ang II 诱导 VSMC 细胞凋亡,然后再用丙酮酸干预细胞,结果细胞凋亡减少,说明丙酮酸(PA)可以抑制细胞凋亡。PA 是三羧酸循环的重要组成部分,它是由磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenol pyruvate, PEP)在丙酮酸激酶催化作用下产生的。当细胞内 PA 增加时催化其所需的丙酮酸激酶可能相应也增加,那么丙酮酸激酶上游丙酮酸激酶激动剂 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2)也处在较高水平。有一项研究阐明我们分析了急性胸主动脉夹层患者(TAAD)和 β -氨基丙腈富马酸盐(BAPN)诱导的 TAAD 小鼠模型的主动脉组织中,观察到主动脉病变中 PKM 2 水平升高。用 PKM 2 激活剂 TEPP-46 治疗显著减弱了小鼠模型中 TAAD 的进展,如降低了发病率和主动脉的管腔直径来证明的[14]。此外,当用 TEPP-46 处理时,BAPN 诱导的小鼠的胸部肿块显示单核细胞和巨噬细胞浸润减少,IL-1 β 、MMP 和 ROS 水平降低。此外,TEPP-46 处理还通过下调 p-STAT 3 和 HIF 1- α 抑制 NOD 样受体(NLR)家族和含 pyrin 结构域蛋白 3(NLRP 3)炎性体的活化[14]。以上其他研究中得出 PKM2 激活剂 TEPP-46 增加降低胸主动脉夹层的发生发展,所以本部分研究中得出 PA 抑制细胞凋亡可能也是类似机制所致。

5. 结论

综上所述,丙酮酸作为三羧酸循环的重要产物,其抑制细胞凋亡可能与其抗氧化、抗炎、提供能量等特性有关。丙酮酸恢复 Ang II 干预损伤的血管平滑肌细胞活力。丙酮酸抑制 Ang II 干预的血管平滑肌细胞进一步凋亡,并有望成为潜在的 Stanford B 型 AD 治疗靶点。

基金项目

新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2022D01D66);新疆维吾尔自治区重点研发任务专项(2022B03022-3)。

参考文献

- [1] Kochanek, K.D., Murphy, S.L., Xu, J., *et al.* (2019) Deaths: Final Data for 2017. *National Vital Statistics Reports*, **68**, 1-77.
- [2] Pinard, A., Jones, G.T. and Milewicz, D.M. (2019) Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases. *Circulation Research*, **124**, 588-606. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.312436>
- [3] Aggarwal, S., Qamar, A., Sharma, V., *et al.* (2011) Abdominal Aortic Aneurysm: A Comprehensive Review. *Experimental & Clinical Cardiology*, **16**, 11-15.
- [4] Norman, P.E. and Curci, J.A. (2013) Understanding the Effects of Tobacco Smoke on the Pathogenesis of Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **33**, 1473-1477. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300158>
- [5] Cui, H., Chen, Y., Li, K., Zhan, R., Zhao, M., Xu, Y., *et al.* (2021) Untargeted Metabolomics Identifies Succinate as a Biomarker and Therapeutic Target in Aortic Aneurysm and Dissection. *European Heart Journal*, **42**, 4373-4385. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab605>
- [6] Zeng, Q., Rong, Y., Li, D., Wu, Z., He, Y., Zhang, H., *et al.* (2020) Identification of Serum Biomarker in Acute Aortic Dissection by Global and Targeted Metabolomics. *Annals of Vascular Surgery*, **68**, 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2020.06.026>
- [7] Zhou, X., Wang, R., Zhang, T., Liu, F., Zhang, W., Wang, G., *et al.* (2019) Identification of Lysophosphatidylcholines and Sphingolipids as Potential Biomarkers for Acute Aortic Dissection via Serum Metabolomics. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, **57**, 434-441. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2018.07.004>
- [8] 王翔魏. 丙酮酸补充与运动能力[J]. 北京体育大学学报, 2002, 25(2): 207-210.
- [9] 干懿洁, 丁树哲. 丙酮酸的抗氧化作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(8): 141-143.
- [10] Postnov, A., Suslov, A., Sobenin, I., Chairkin, I., Sukhorukov, V., Ekta, M.B., *et al.* (2021) Thoracic Aortic Aneurysm: Blood Pressure and Inflammation as Key Factors in the Development of Aneurysm Dissection. *Current Pharmaceutical Design*, **27**, 3122-3127. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210210142200>
- [11] Hu, Y., Lu, L., Qiu, Z., Huang, Q., Chen, Y. and Chen, L. (2018) Mechanical Stretch Aggravates Aortic Dissection by Regulating MAPK Pathway and the Expression of MMP-9 and Inflammation Factors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **108**, 1294-1302. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.129>
- [12] Lian, G., Li, X., Zhang, L., Zhang, Y., Sun, L., Zhang, X., *et al.* (2019) Macrophage Metabolic Reprogramming Aggravates Aortic Dissection through the Hif1 α -Adam17 Pathway. *eBioMedicine*, **49**, 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.041>
- [13] Luo, W., Wang, Y., Zhang, L., Ren, P., Zhang, C., Li, Y., *et al.* (2020) Critical Role of Cytosolic DNA and Its Sensing Adaptor STING in Aortic Degeneration, Dissection, and Rupture. *Circulation*, **141**, 42-66. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.119.041460>
- [14] Le, S., Zhang, H., Huang, X., Chen, S., Wu, J., Chen, S., *et al.* (2020) PKM2 Activator TEPP-46 Attenuates Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-Mediated Il-1 β Secretion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, **25**, 364-376. <https://doi.org/10.1177/1074248420919966>