

本文引用: 陈豪, 朱诗瑶, 贺雪珂, 等. 过氧亚硝酸盐通过诱导己糖激酶1 硝基化修饰促进血管内皮细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(11): 930-936. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.11.002.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2025)33-11-0930-07

过氧亚硝酸盐通过诱导己糖激酶1 硝基化修饰促进血管内皮细胞凋亡

陈豪¹, 朱诗瑶¹, 贺雪珂¹, 陈蕊¹, 王思堃¹, 赵小梅², 姜淼¹

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地,
2. 南华大学公共卫生学院, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 评估血管内皮细胞中特定蛋白质发生酪氨酸硝基化修饰的现象及其对线粒体介导的细胞凋亡的影响。**[方法]** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 分为对照组(二甲亚砜处理)、3-吗啉磺胺(SIN-1)组和 SIN-1+5,10,15,20-四苯基卟啉铁(FeTPP)组, 24 h 后检测己糖激酶1(HK1)硝基化修饰水平、线粒体膜电位、活性氧生成以及内皮细胞增殖与凋亡水平。利用基因编辑技术构建 HK1 敲除人脐静脉内皮细胞系, 检测其增殖与凋亡水平。**[结果]** 过氧亚硝酸盐生成剂 SIN-1 处理人脐静脉内皮细胞后, HK1 蛋白质硝基化修饰水平显著升高($P<0.01$), 活性氧生成显著增加, 线粒体膜电位显著下降, 内皮细胞增殖能力显著下降, 内皮细胞凋亡水平显著增加(均 $P<0.01$)。过氧亚硝酸盐分解催化剂 FeTPP 能够逆转上述效应($P<0.01$)。此外, HK1 基因敲除也展现出类似的抗氧化效果, 内皮细胞的增殖能力显著降低, 而凋亡水平则显著升高($P<0.01$)。**[结论]** 过氧亚硝酸盐能够诱导血管内皮细胞中 HK1 的硝基化修饰水平升高, 这可能是通过促进线粒体活性氧的产生, 进而加速内皮细胞凋亡的过程。

[关键词] 过氧亚硝酸盐; 己糖激酶1; 硝基化修饰; 血管内皮细胞

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

Peroxynitrite promotes apoptosis of vascular endothelial cells by inducing nitration modification of hexokinase-1

CHEN Hao¹, ZHU Shiyao¹, HE Xueke¹, CHEN Rui¹, WANG Sikun¹, ZHAO Xiaomei², JIANG Miao¹

1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & International Joint Laboratory for Arteriosclerotic Disease, 2. School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the tyrosine nitration modification of specific proteins in vascular endothelial cells and its impact on mitochondria-mediated apoptosis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured *in vitro* and divided into three groups: control group (treatment with dimethyl sulfoxide), 3-morphansulam (SIN-1) group, and SIN-1+Fe(III) 5,10,15,20-(tetraphenyl)porphyrin (FeTPP) group. After 24 h, the levels of hexokinase 1 (HK1) nitration modification, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) production, and endothelial cell proliferation and apoptosis were assessed. A human umbilical vein endothelial cell line knockout of HK1 was constructed using gene editing technology, and its proliferation and apoptosis levels were detected. **Results** After treatment of human umbilical vein endothelial cells with peroxynitrite generator SIN-1, the level of HK1 protein nitration modification significantly increased ($P<0.01$), reactive oxygen species production significantly increased, mitochondrial membrane potential significantly decreased, endothelial cell proliferation ability significantly decreased, and endothelial cell apoptosis level significantly increased (all $P<0.01$). Peroxynitrite decomposition catalyst FeTPP could reverse the above effect ($P<0.01$). In addition, HK1 gene knockout also exhibited similar antioxidant effects, with a significant decrease in endothe-

[收稿日期] 2025-04-23

[修回日期] 2025-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(32101018);湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30522)

[作者简介] 陈豪, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: 1145537170@qq.com。姜淼, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: miao_jiang@usc.edu.cn。

lial cell proliferation ability and a significant increase in apoptosis levels ($P < 0.01$). **Conclusion** Peroxynitrite can induce an increase in the level of nitration modification of HK1 in vascular endothelial cells, which may be achieved by promoting the production of mitochondrial reactive oxygen species, thereby accelerating the process of endothelial cell apoptosis. [KEY WORDS] peroxynitrite; hexokinase 1; nitration modification; vascular endothelial cell

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种与脂质代谢紊乱和内皮屏障损伤相关的慢性炎症性病变^[1]。在 As 病理过程中,炎症反应诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的过度表达,促使一氧化氮(nitric oxide, NO)与超氧阴离子(O_2^-)反应生成过氧亚硝酸盐($ONOO^-$)^[2]。 $ONOO^-$ 通过过度激活血管 ATP 敏感性钾通道损害内皮依赖性血管舒张,同时伴随线粒体钙超载和 ROS 生成^[3]。 $ONOO^-$ 能够与多种蛋白质反应,导致酪氨酸残基硝基化修饰生成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT),特定蛋白质的硝基化修饰可能改变其结构和功能,引起内皮屏障功能障碍^[4-7]。尽管 As 斑块及 As 相关心血管疾病患者循环系统中 3-NT 的水平显著升高^[8],表明其与 As 进展密切相关,但其作为疾病标志物或者致病因素的作用尚未明确^[9]。

线粒体作为细胞凋亡调控的关键细胞器,其功能异常,例如线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)过度开放、线粒体跨膜电位(mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)下降和谷胱甘肽外流等现象,均可促进 ROS 的积累和细胞凋亡的进程^[10-12]。线粒体通过单电子转移途径生成 O_2^- ,这是 ROS 的重要来源。由于 O_2^- 的扩散受限,线粒体被认为是 $ONOO^-$ 生成的主要场所^[13]。此外,线粒体膜上的蛋白质是 $ONOO^-$ 攻击的主要靶点。己糖激酶(hexokinase, HK)是定位在线粒体外膜的糖酵解关键激酶,负责将葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,与电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)相互作用以抑制 mPTP 持续开放^[14],并通过与线粒体内外膜蛋白在“接触位点”的互作稳定 mPTP 结构,抑制其开放及细胞色素 c 释放,进而抵抗细胞凋亡^[14-15]。本研究通过分析内皮细胞蛋白质组学数据,发现定位于线粒体膜上的 HK1 可发生酪氨酸硝基化修饰,提示 HK1 可能是 $ONOO^-$ 攻击的靶点之一。因此,本研究拟探索 HK1 可能的硝基化修饰位点,探讨 $ONOO^-$ 在体外对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡的影响,揭示 $ONOO^-$ 诱导 HK1 酪氨酸硝基化修饰在 As 内皮损伤中的潜在作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

一步法聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)凝胶快速制备试剂盒(诺唯赞);胰蛋白酶和 RPMI 1640 培养基(Gibco);胎牛血清(依科赛);二甲基亚砷(索莱宝);蛋白上样缓冲液(康为世纪);彩色预染蛋白分子 Marker(贝茵莱);MitoSOX, JC-1 和 Annexin V-FITC 试剂盒(碧云天);3-NT(Bioss);HK1、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Proteintech);RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、Bax、Bcl-2 抗体(ABclonal)和 β -actin 抗体(塞维儿)。

1.2 GPS-YN02 工具预测硝基化修饰位点

HK1 的潜在硝基化修饰位点通过在线生物信息学工具 GPS-YN02 (<http://yno2.biocuckoo.org/>)进行预测^[16]。该工具基于组学预测系统算法,计算蛋白质硝基化修饰位点。用户只需上传 HK1 序列,即可直接导出预测结果。

1.3 细胞培养及药物处理

HUVEC 从液氮中复苏,采用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO_2 的培养箱中进行常规培养。待细胞密度达 90% 时传代,稳定生长后进行实验。弃原培养基,使用 PBS 缓冲液清洗细胞,经胰酶消化处理后再加入含血清的培养基以终止消化反应。将细胞悬液接种于 6 孔板(2 mL/孔,含 1.2×10^6 个细胞),培养 24 h 后分组处理:①对照组:加入等体积二甲基亚砷;②SIN-1 组:加入 2 μ L SIN-1 溶液(终浓度为 1 mmol/L)培养 4 h;③SIN-1 + FeTPP 组:在 SIN-1 处理 4 h 后加入 FeTPP(终浓度为 5 μ mol/L)处理。每组设 3 个复孔。

1.4 HK1 敲除内皮细胞系的构建

通过 Lipo3000 转染试剂将靶向 HK1 的 CRISPR/Cas9 质粒转染至生长状态良好的 HUVEC(约 80% 密度),转染 48 ~ 72 h 后加入嘌呤霉素进行持续筛选 72 h。随后,将细胞消化成单细胞悬液,并扩增至足够数量,最终获得稳定转染的细胞株,以供后续实验使用。

1.5 蛋白质提取与鉴定

在提取全细胞裂解液时,先用 PBS 缓冲液清洗

贴壁的 HUVEC, 随后用刮匙将细胞收集至冰上, 以 1 000 r/min 的速度在 4 ℃ 条件下离心 5 min, 弃去上清液, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 期间每隔 10 min 进行涡旋混匀。最后, 以 12 000 r/min 的速度在 4 ℃ 条件下离心 10 min, 收集上清液。

1.6 蛋白质免疫共沉淀

在免疫沉淀富集 HK1 蛋白的过程中, 采用 BCA 法对蛋白进行定量并调整其浓度, 随后将等量的上清液加入已偶联 HK1 抗体的磁珠中, 于 4 ℃ 条件下旋转孵育 12 h。孵育完成后, 利用磁力架分离磁珠, 并依次使用 PBS 和平衡缓冲液洗涤以去除非特异性结合的蛋白。接着, 用 RIPA 裂解液重悬磁珠, 经煮沸变性处理后, 通过 SDS-PAGE 进行蛋白分离, 最后采用蛋白质印迹进行验证。

1.7 蛋白质印迹检测

蛋白质样品经 5×Loading buffer 煮沸变性, SDS-PAGE 分离 (浓缩胶 25 mA, 分离胶 50 mA), 湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉/TBST 室温封闭 2 h。按说明书稀释一抗, 4 ℃ 孵育过夜, HRP 标记二抗 (TBST 稀释), 室温孵育 1 h, Chemi Doc XRS 系统曝光, Quantity One 软件分析其灰度值。

1.8 线粒体膜电位检测

JC-1 染色检测线粒体膜电位时, 收集处理后的细胞悬液, 加入 10 mg/L JC-1 探针, 于 37 ℃ 避光孵育 20 min, 使用流式细胞仪检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 FL1 520 nm, FL2 585 nm, 使用 Flow Jo 软件分析红/绿荧光比值 ($\Delta\Psi_m$ 降低提示线粒体功能障碍)。

1.9 线粒体超氧化物检测

将收集并处理后的细胞悬液加入适量的 MitoSOX Red 染色工作液, 置于细胞培养箱中, 于 37 ℃ 孵育 30 min。孵育完成后, 小心吸除上清液, 并用 PBS 轻柔洗涤 3 次。接着, 加入 2 mL PBS, 使用荧光显微镜进行拍照记录。

1.10 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡

收集处理后的细胞悬液, 以 600 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。随后依次加入 Annexin V-FITC 结合液, 轻轻重悬细胞, 再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀。在室温下避光孵育 20 min, 然后用流式细胞仪进行检测。

1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据统计分析与作图, 实验结果分别采用单样本 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

1.12 伦理申明

实验用来源细胞系购自商业供应商, 经 STR 认证及支原体检测, 符合生物安全规范。

2 结果

2.1 HK1 是血管内皮细胞中潜在的酪氨酸硝基化修饰蛋白

首先, 通过在线工具 GPS-YN02 预测 HK1 的硝基化修饰位点。结果显示, HK1 的酪氨酸残基 112、301、560 和 749 可能是潜在硝基化修饰位点 (表 1), 这些位点位于葡萄糖-6-磷酸结合结构域内。随后, 通过蛋白质免疫沉淀验证 HK1 硝基化修饰水平。将 HUVEC 接种于培养板中培养 24 h, 加入过氧亚硝酸盐生成剂 SIN-1 处理 4 h。抗 3-NT 实验显示, 与对照组相比, SIN-1 处理后细胞总硝基化修饰蛋白质水平升高 ($P < 0.01$); 分别使用 HK1 和 3-NT 作为诱饵蛋白, 蛋白质免疫沉淀进一步证实 HK1 硝基化修饰水平增加。定量分析表明, 与对照组相比, SIN-1 处理后细胞中硝基化修饰的 HK1 与总 HK1 的比值升高, 而过氧亚硝酸盐清除剂 FeTPP 能降低 HK1 硝基化修饰水平 (均 $P < 0.01$; 图 1)。

2.2 SIN-1 处理导致内皮细胞线粒体膜电位降低

已有研究表明, HK 可能通过与 VDAC 相互作用抑制 mPTP 开放。为验证 SIN-1 对线粒体膜电位的影响, 采用 JC-1 染色试剂盒进行检测。流式细胞仪检测结果显示, 与对照组相比, SIN-1 处理后内皮细胞线粒体膜电位降低, 而 FeTPP 可逆转这一效应 ($P < 0.01$; 图 2)。

2.3 SIN-1 增加内皮细胞 ROS 生成

线粒体膜电位的降低表明氧化应激程度加剧。通过 ROS 检测试剂盒分析 HUVEC 中的 ROS 水平。结果显示, 与对照组相比, SIN-1 处理后内皮细胞 ROS 的生成增加, 而 FeTPP 能有效抑制 SIN-1 诱导的 ROS 生成 ($P < 0.01$; 图 3)。

表 1. GPS-YN02 预测 HK1 的潜在蛋白质硝基化修饰位点
Table 1. Potential tyrosine nitration modification sites of HK1 predicted by GPS-YN02

位点	硝基化肽段	得分	阈值
112	VHMESEVYDTPENIV	0.992	0.554
301	EKMVSGMYLGELVRL	1.177	1.065
560	VEMHNKIYSIPLEIM	0.676	0.554
749	EKMISGMYLGELVRN	1.698	1.065

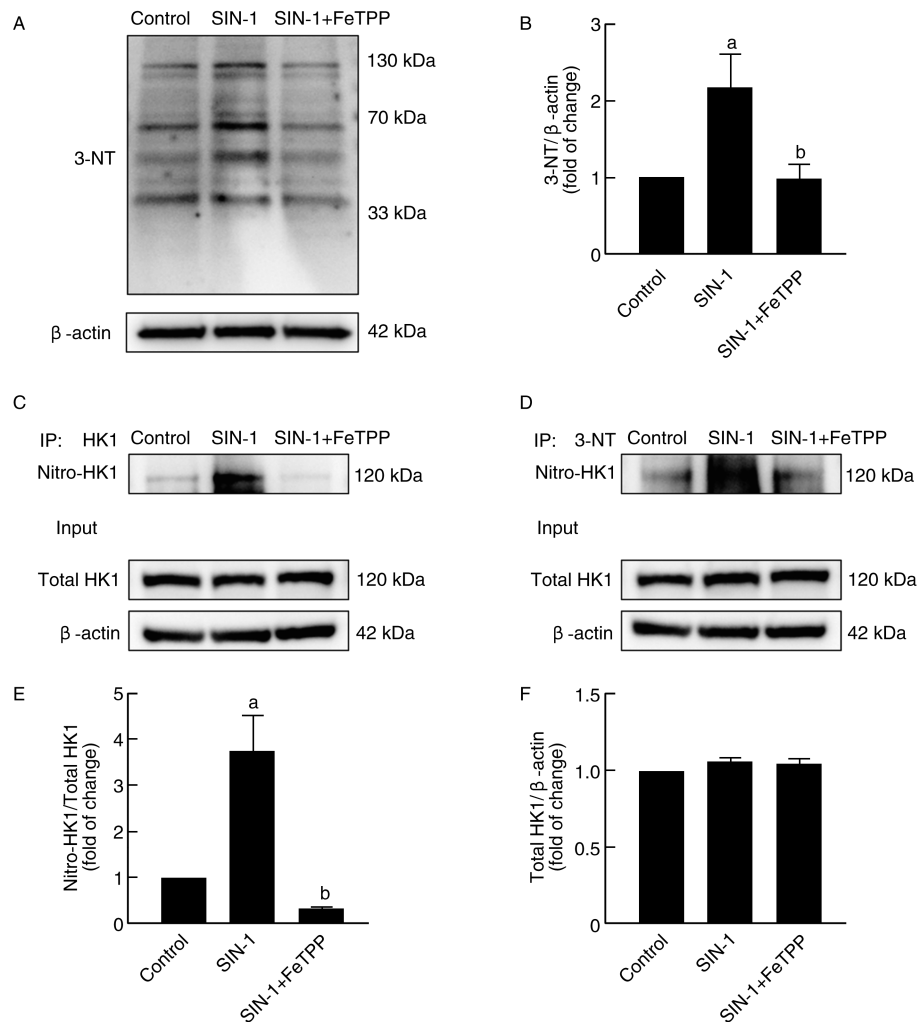


图 1. SIN-1 处理显著增加内皮细胞中 HK1 的酪氨酸硝基化修饰水平 ($n=3$)

A、B 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后用蛋白质印迹检测 3-NT 的表达水平;
C-F 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后用蛋白质免疫沉淀检测 HK1 硝基化修饰水平。
a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SIN-1 组比较。

Figure 1. SIN-1 treatment significantly increased the tyrosine nitration modification level of HK1 in endothelial cells ($n=3$)

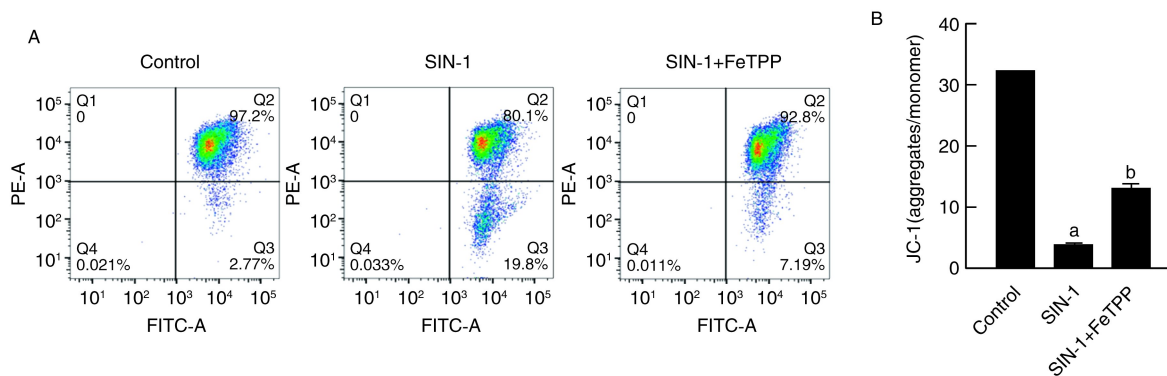


图 2. SIN-1 处理显著降低内皮细胞线粒体膜电位 ($n=3$)

A、B 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后将细胞消化为悬液, 用 JC-1 试剂盒处理, 最后采用流式细胞仪进行分析。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SIN-1 组比较。

Figure 2. SIN-1 treatment significantly reduced mitochondrial membrane potential in endothelial cells ($n=3$)

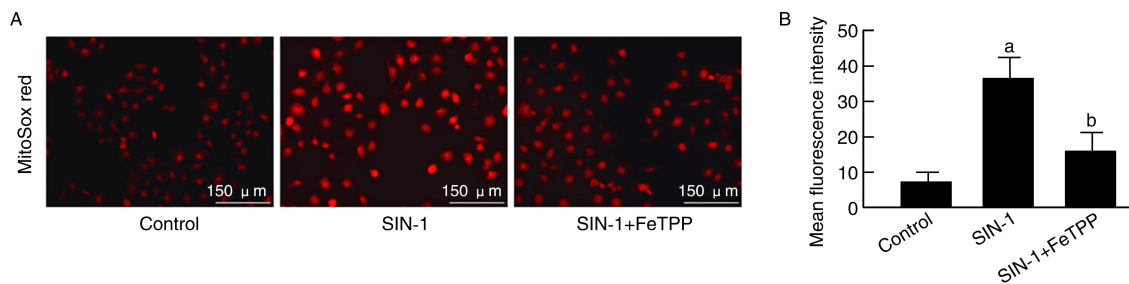


图3. SIN-1 处理显著增加内皮细胞 ROS 生成 ($n=3$)

A、B 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后用线粒体超氧化物检测试剂盒检测细胞内 ROS 生成。

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SIN-1 组比较。

Figure 3. SIN-1 treatment significantly increased ROS production in endothelial cells ($n=3$)

2.4 SIN-1 显著抑制内皮细胞增殖能力

通过检测 PCNA 表达评估 SIN-1 对细胞增殖的影响。结果显示, 与对照组相比, SIN-1 处理后内皮细胞 PCNA 的表达降低, 而 FeTPP 处理后内皮细胞 PCNA 的表达较 SIN-1 组升高 ($P<0.01$; 图 4)。表明 SIN-1 显著抑制细胞增殖, 而 FeTPP 可逆转该抑制效应。

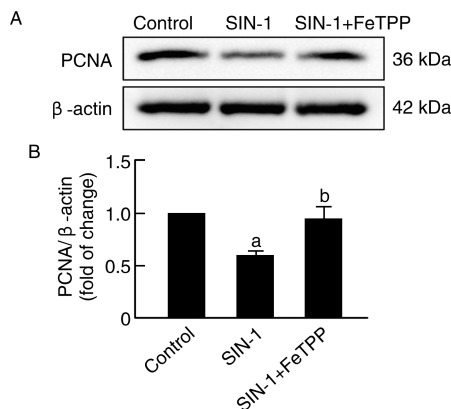


图4. SIN-1 处理显著抑制内皮细胞增殖能力 ($n=3$)

A、B 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后用蛋白质印迹检测 PCNA 的表达。

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SIN-1 组比较。

Figure 4. SIN-1 treatment significantly inhibited endothelial cell proliferation ability ($n=3$)

2.5 SIN-1 处理显著促进内皮细胞凋亡

为探究 SIN-1 对细胞凋亡的影响, 检测了凋亡标志物表达。与对照组相比, SIN-1 处理后内皮细胞 Annexin V 阳性荧光染色比例显著升高 ($P<0.01$); 而 FeTPP 处理后内皮细胞 Annexin V 阳性荧光染色比例较 SIN-1 组显著降低 ($P<0.01$)。蛋白质印迹进一步显示, 与对照组相比, SIN-1 处理后促凋亡蛋白 Bax 的表达上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达下调 ($P<0.01$; 图 5)。

2.6 HK1 基因敲除模拟 SIN-1 处理效应

通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向敲除 HK1, 成功构建了稳定的细胞株 (HK1-KO)。蛋白质印迹结果显示, HK1 的表达显著降低 ($P<0.01$)。功能验证表明, HK1-KO 细胞的增殖能力显著降低, 凋亡率显著升高 ($P<0.01$; 图 6), 这与 SIN-1 处理的效果一致。

3 讨论

As 是一种以炎症和脂质代谢紊乱为特征的血管病变, 是急性心血管事件的主要诱因之一。循环中高水平的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 浸润进入动脉血管壁内膜层并氧化为氧化型低密度脂蛋白, 诱导内皮细胞炎症反应, 分泌炎症因子和趋化因子, 并招募白细胞进入动脉壁, 最终形成血管壁内炎症微环境^[17]。动脉血管壁内的炎症微环境促使内皮细胞产生 ROS 增多, 导致内皮功能障碍。As 病变血管内皮细胞的 3-NT 阳性区域显著增加, 提示蛋白质酪氨酸硝基化修饰与 As 进展相关^[6]。研究表明, ONOO⁻ 可通过硝基化修饰细胞外基质分子 (如纤连蛋白 1、胶原蛋白和波形蛋白) 加剧基质损伤, 并促进 As 发展。然而, ONOO⁻ 对 As 斑块微环境中细胞内蛋白质的作用鲜有报道。

线粒体是 ONOO⁻ 生成的主要场所, 其蛋白参与能量代谢、氧化应激等关键生理功能^[18]。敲低线粒体氧化还原调控关键基因硫氧还蛋白还原酶 2 (thioredoxin reductase 2, TrxR2) 可显著增加内皮细胞 ONOO⁻ 生成^[19]。线粒体特异性荧光探针 (MitoPY1) 证实 ONOO⁻ 主要在线粒体内生成, 同时组织中 3-NT 的表达显著升高^[19]。在缺血再灌注损伤心肌细胞模型中, ONOO⁻ 可与线粒体腺苷酸转运体和 VDAC 发生反应, 削弱其与 HK2 的结合能力, 进而诱导细

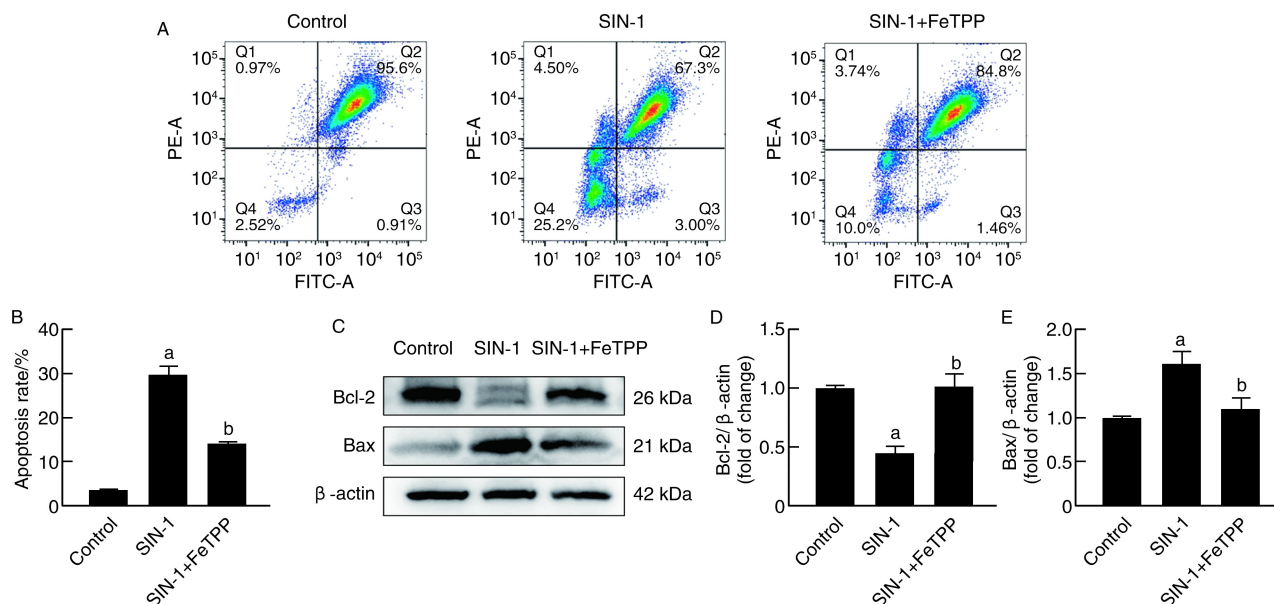


图 5. SIN-1 处理显著促进内皮细胞凋亡 ($n=3$)

A、B 为用 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后将细胞消化为悬液, 用 Annexin V-FITC 试剂盒处理后进行流式细胞仪分析; C-E 为 1 mmol/L SIN-1 处理 HUVEC 4 h, 再加入 5 μ mol/L FeTPP 处理 24 h, 然后用蛋白质印迹检测凋亡相关蛋白表达。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SIN-1 组比较。

Figure 5. SIN-1 treatment significantly promoted endothelial cell apoptosis ($n=3$)

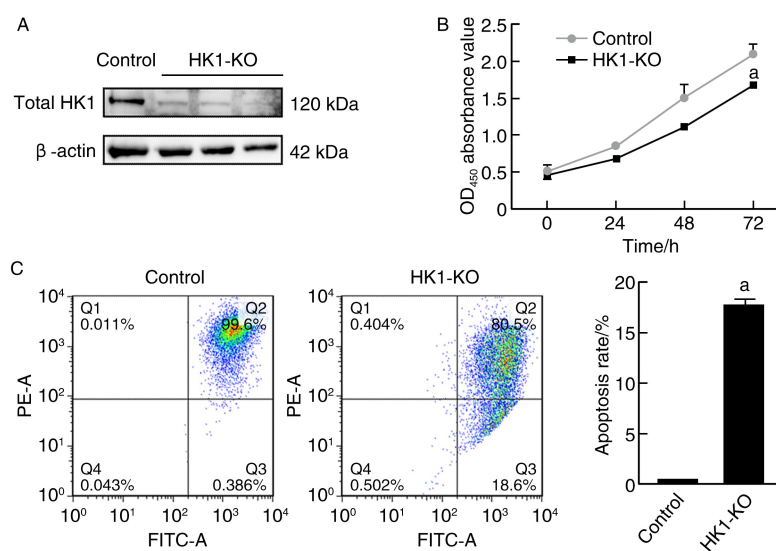


图 6. HK1 基因敲除模拟 SIN-1 处理效应

A 为通过 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 HK1 构建的 HUVEC 细胞系, 蛋白质印迹检测结果显示 HK1 成功敲除; B 为使用 CCK-8 法检测细胞活力; C 为使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 6. HK1 knockout simulated SIN-1 treatment effect ($n=3$)

胞凋亡^[20]。免疫抑制剂环孢素 A 的心血管不良反应之一, 是通过促进 ONOO⁻ 的生成, 进而引发蛋白质硝基化。环孢素 A 处理内皮细胞后, 线粒体锰超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2) 的酪氨酸 34 位点发生硝基化修饰, 导致酶活性受到抑制, 线粒体膜电位升高, 以及细胞呼吸过程受阻^[21]。

缺血再灌注损伤心肌细胞的质谱分析显示, 大量能量代谢相关的蛋白为线粒体蛋白^[22]。这些结果均表明, 线粒体蛋白可能是 ONOO⁻ 的主要靶标。

HK1 是定位于线粒体膜的糖代谢关键酶。根据蛋白质组学的研究结果, 内皮细胞在氧化应激的微环境中, HK1 蛋白可能发生硝基化修饰。为验证

HK1 硝基化修饰在 As 中的作用,本研究用 ONOO⁻ 供体 SIN-1 处理内皮细胞,通过蛋白质印迹检测发现 HK1 硝基化水平显著升高。已有研究显示, HK1 通过结合促凋亡蛋白 Bax/Bak 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 来抑制细胞凋亡,其作用机制可能在于延长 mPTP 的开放时间,从而促进线粒体膜电位的降低。本研究结果显示, ONOO⁻ 供体 SIN-1 处理显著降低线粒体膜电位,而 ONOO⁻ 清除剂 FeTPP 可逆转该效应。另外, FeTPP 也能抑制 SIN-1 诱导的细胞凋亡。

本研究证实,定位于线粒体的蛋白质 HK1 是 ONOO⁻ 攻击的关键靶点,并且敲除 HK1 表现出与 ONOO⁻ 处理相似的促凋亡效应。ONOO⁻ 可能通过促进 HK1 硝基化修饰,削弱其稳定 mPTP 的能力,导致线粒体膜电位下降及细胞凋亡。然而,本研究尚未通过点突变实验验证 HK1 上 ONOO⁻ 的具体硝基化修饰位点,也未检测硝基化修饰的 HK1 与 mPTP 关键蛋白的结合能力,仍需进一步实验加以验证。综上, ONOO⁻ 处理显著增加内皮细胞线粒体蛋白质硝基化修饰,而抗氧化处理可抑制硝基化修饰并减少细胞凋亡。HK1 有望成为治疗 ROS/RNS 诱导的内皮损伤及相关血管疾病的潜在药物靶点。

[参考文献]

- [1] SARRAJU A, NISSEN S E. Atherosclerotic plaque stabilization and regression: a review of clinical evidence [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(7): 487-497.
- [2] KOTLYAROV S. Immune function of endothelial cells: evolutionary aspects, molecular biology and role in atherogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9770.
- [3] YUAN T, YANG T, CHEN H, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis [J]. *Redox Biol*, 2019, 20: 247-260.
- [4] 朱诗瑶, 贺雪珂, 陈豪, 等. 硝基化修饰蛋白质在心血管内皮功能障碍中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(1): 65-71.
ZHU S Y, HE X K, CHEN H, et al. The role of nitrated modified proteins in cardiovascular endothelial dysfunction [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(1): 65-71.
- [5] WANG F, YUAN Q, CHEN F, et al. Fundamental mechanisms of the cell death caused by nitrosative stress [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 742483.
- [6] JIANG M, ZHAO X M, JIANG Z S, et al. Protein tyrosine nitration in atherosclerotic endothelial dysfunction [J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 529: 34-41.
- [7] XU S, CHUANG C Y, HAWKINS C L, et al. Quantitative analysis of the proteome and protein oxidative modifications in primary human coronary artery endothelial cells and associated extracellular matrix [J]. *Redox Biol*, 2025, 81: 103524.
- [8] LAVIE L, SI-ON E, HOFFMAN A. Markers of carotid plaque destabilization in patients with sleep-disordered breathing [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 811916.
- [9] DAIBER A, MÜNZEL T. Increased circulating levels of 3-nitrotyrosine autoantibodies: marker for or maker of cardiovascular disease? [J]. *Circulation*, 2012, 126(20): 2371-2373.
- [10] CHEN Z, CHEN J, CHEN Y, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore mediated myocardial damage after perinatal asphyxia in neonatal rats [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2025, 44(3): 177-195.
- [11] 秦文华, 袁楚楚, 孙玉慧, 等. 琥珀酸/GPR91 通过 DHODH/CoQ10 促血管内皮细胞线粒体损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(6): 466-472.
QIN W H, YUAN C C, SUN Y H, et al. Succinate/GPR91 promotes mitochondrial damage in vascular endothelial cells through DHODH/CoQ10 [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(6): 466-472.
- [12] XIA D, CHEN Y, LUO G, et al. Atherosclerosis: from the disruption of mitochondrial membrane potential to the potential interventional strategies [J]. *Curr Med Chem*, 2023, 30(38): 4355-4373.
- [13] GERDES H J, YANG M, HEISNER J S, et al. Modulation of peroxynitrite produced via mitochondrial nitric oxide synthesis during Ca²⁺ and succinate-induced oxidative stress in cardiac isolated mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2020, 1861(12): 148290.
- [14] DUAN C, KUANG L, HONG C, et al. Mitochondrial Drp1 recognizes and induces excessive mPTP opening after hypoxia through BAX-PiC and LRRK2-HK2 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1050.
- [15] SCHINDLER A, FOLEY E. Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(12): 2685-2692.
- [16] LIU Z, CAO J, MA Q, et al. GPS-YN02: computational prediction of tyrosine nitration sites in proteins [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(4): 1197-1204.
- [17] CETIN E, RABY A C. Understanding atherosclerotic plaque cellular composition: recent advances driven by single cell omics [J]. *Cells*, 2025, 14(11): 770.
- [18] 闫明静, 沈涛. 线粒体功能障碍与血管内皮损伤的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(10): 829-837.
YAN M J, SHEN T. The research progress on mitochondrial dysfunction and vascular endothelial cell injury [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(10): 829-837.
- [19] KAMERITSCH P, SINGER M, NUERNBERG C, et al. The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(7): e1921828118.
- [20] YANG M, XU Y, HEISNER J S, et al. Peroxynitrite nitrates adenine nucleotide translocase and voltage-dependent anion channel 1 and alters their interactions and association with hexokinase II in mitochondria [J]. *Mitochondrion*, 2019, 46: 380-392.
- [21] REDONDO-HORCAJO M, ROMERO N, MARTÍNEZ-ACEDO P, et al. Cyclosporine a-induced nitration of tyrosine 34 MnSOD in endothelial cells: role of mitochondrial superoxide [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(2): 356-365.
- [22] TATARKOVA Z, KOVALSKA M, SIVONOVA M K, et al. Tyrosine nitration of mitochondrial proteins during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(2): 217-227.

(此文编辑 文玉珊)