

本文引用: 高海钧, 王若琳, 任佳禹, 等. PDK1 在 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤及其功能障碍中的作用研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(1): 17-26. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.01.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-01-0017-10

· 实验研究 ·

PDK1 在 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤及其功能障碍中的作用研究

高海钧^{1,2}, 王若琳¹, 任佳禹¹, 周慧亚¹, 曲鹏^{1,3}

1. 大连医科大学附属第二医院心脏及血管疾病研究所, 辽宁省大连市 116000; 2. 盘锦辽油宝石花医院心血管重症医学科, 辽宁省盘锦市 124010; 3. 大连理工大学医学部, 辽宁省大连市 116024

[摘要] **[目的]** 探讨丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1 (PDK1) 对内皮细胞损伤及其功能障碍的影响。**[方法]** 采用 siRNA-PDK1 敲低 PDK1 的表达, 并使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 或氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 以探究 PDK1 在 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤及其生物学功能障碍中的作用。使用活性氧 (ROS) 及线粒体活性染色试剂盒检测 HUVEC 中 ROS 的产生及线粒体损伤状况。使用流式细胞凋亡试剂盒检测 HUVEC 的凋亡水平, 并通过结晶紫染色和 Dil 染色检测 HUVEC 的损伤及其对 THP-1 细胞的募集和黏附能力的改变。通过 Western blot 和 RT-qPCR 检测 CD86、CD206、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 等的 mRNA 和蛋白表达。通过免疫荧光染色评估 CD86 和 CD206 的表达水平。使用试剂盒测定超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性和丙二醛 (MDA) 的含量, 采用 ELISA 试剂盒检测 MCP-1、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 等细胞因子的分泌情况。**[结果]** 与 ox-LDL 处理的 HUVEC 相比, 敲低 PDK1 表达后, ROS 的产生减少, 线粒体损伤减轻, SOD 活性恢复, MDA 含量减少, 细胞凋亡水平降低, 核因子 κ B (NF- κ B) 和 NLRP3 炎症小体的激活受到抑制, 炎症因子 (IL-1 β 、IL-18) 和趋化黏附因子 (MCP-1、ICAM-1、VCAM-1) 的释放减少, 黏附的 THP-1 细胞数量减少, THP-1 细胞中 CD206、精氨酸 1 (Arg-1) 的表达增加, THP-1 细胞中 CD86、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达受到抑制 (均 $P < 0.05$)。**[结论]** 敲低血管内皮细胞中 PDK1 的表达可以减少 ox-LDL 处理引起的内皮细胞氧化应激和炎症反应, 进而改善内皮细胞生物学功能。

[关键词] 人脐静脉内皮细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1; 氧化应激; 炎症反应

[中图分类号] R543; R363

[文献标识码] A

Research on the role of PDK1 in ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and dysfunction

GAO Haijun^{1,2}, WANG Ruolin¹, REN Jiayu¹, ZHOU Huiya¹, QU Peng^{1,3}

1. Institute of Heart and Vascular Diseases, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116000, China; 2. Department of Cardiovascular Critical Care Medicine, Genertec Liaoyou Gem Flower Hospital, Panjin, Liaoning 124010, China; 3. Faculty of Medicine, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1 (PDK1) on endothelial cell injury and dysfunction. **Methods** siRNA-PDK1 was used to knock down PDK1 expression, and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with phosphate-buffered saline (PBS) or oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to investigate the role of PDK1 in ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and its biological dysfunction. Reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial damage in HUVEC were detected using ROS and mitochondrial activity staining kits. The apoptosis levels of HUVEC were detected via flow cytometry apoptosis assay kit, and the damage of HUVEC and its changes in recruitment and adhesion ability to THP-1 cells were detected through crystal violet staining and Dil staining. The mRNA and protein expression of CD86, CD206, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), interleukin-1 β (IL-1 β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were detected by Western blot and RT-qPCR.

[收稿日期] 2025-07-02

[修回日期] 2025-10-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(91739119)

[作者简介] 高海钧, 硕士, 研究方向为冠状动脉粥样硬化, E-mail: 1477338176@qq.com。通信作者曲鹏, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠状动脉粥样硬化, E-mail: Qupeng777@aliyun.com。

The expression levels of CD86 and CD206 were evaluated by immunofluorescence staining. Superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) concentrations were measured with corresponding kits, while the secretions of cytokines including MCP-1, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were detected with ELISA kits. **Results** Compared with HUVEC treated with ox-LDL, knocking down PDK1 expression resulted in reduced ROS production, reduced mitochondrial damage, restored SOD activity, decreased MDA concentrations, decreased apoptosis levels, inhibited activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and NLRP3 inflammasomes, decreased release of inflammatory factors (IL-1 β and IL-18) and chemokines (MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1), decreased number of THP-1 cells, increased expression of CD206 and arginine-1 (Arg-1) in THP-1 cells, and inhibited expression of CD86 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in THP-1 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion** Knocking down the expression of PDK1 in endothelial cells can reduce oxidative stress and inflammatory response caused by ox-LDL, thereby improving the biological function of endothelial cells.

[**KEY WORDS**] human umbilical vein endothelial cell; oxidized low density lipoprotein; pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1; oxidative stress; inflammatory response

血管内皮细胞作为维持血管正常生理功能的关键组成部分,其损伤及功能障碍是动脉粥样硬化的起始环节^[1-5]。受损的血管内皮细胞募集单核细胞,促使其向血管内膜下迁移并黏附,进而引发血管炎症反应^[6]。近年来的研究显示,糖酵解在维持血管内皮细胞的功能稳定方面起着至关重要的作用^[7],丙酮酸脱氢酶激酶同工酶(pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme, PDK)家族的活性是糖酵解过程的关键因素,其对血管内皮细胞功能的影响不可忽视。

PDK 家族呈现出不同的表型与分布特征,其中 PDK1、PDK2、PDK4 存在于心脏之中,并且参与心血管疾病的发生发展。例如,PDK2 和 PDK4 能够通过影响血管损伤后的再狭窄以及血管钙化过程,参与心血管疾病的发生^[8-11]。在人类动脉粥样硬化斑块中,PDK1 的表达与 CD4⁺T 细胞和巨噬细胞活化相关的促炎标志物呈正相关^[12],但 PDK1 影响动脉粥样硬化的具体机制有待进一步探索。

既往研究表明,PDK 家族的小分子抑制剂二氯乙酸钠(dichloroacetate, DCA)对 PDH^{S232}(PDK1 磷酸化的特异性位点)的抑制效果非常显著。同时,DCA 还是一种可口服的心血管治疗药物,这从侧面证实了 PDK1 或许是心血管疾病新的潜在治疗靶点^[13-14]。但目前,PDK1 在维持血管内皮细胞功能稳定方面的作用尚未得到明确阐释。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是否会通过调控血管内皮细胞中的 PDK1,加重血管内皮细胞的损伤及功能障碍,进而影响动脉粥样硬化进程,值得深入探究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endo-

thelial cell, HUVEC)和 THP-1 细胞购自普诺赛生命科学与技术有限公司;佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)购自 MedChemExpress;DCA 购自 Sigma-Aldrich;Lipofectamine 3000 购自 ThermoFisher;二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)染色试剂盒购自凯基生物;mitoSOXTM 染色试剂盒购自 Invitrogen;JC-1 染色试剂盒和 Dil 染色试剂盒购自碧云天;结晶紫染色液、RIPA 裂解缓冲液和含 DAPI 封片剂购自索莱宝;凋亡检测试剂盒购自 BD Biosciences;SYBR Green 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;ECL 荧光化学发光试剂盒购自 Tanon;核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)p65 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)抗体购自 Cell Signaling Technology;PDK2 和 PDK4 抗体购自博研生物;CD86、CD206、PDK1、p-NF- κ B p65、NOD 样受体蛋白 3(NOD like receptor protein 3, NLRP3)、白细胞介素 18(interleukin-18, IL-18)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、GAPDH、山羊抗兔 IgG 及山羊抗小鼠 IgG 的抗体购自 Proteintech;细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、IL-1 β 和 IL-18 的 ELISA 试剂盒购自上海将来实业股份有限公司和睿信生物科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白测定试剂盒购自 Coolaber。

1.2 细胞培养与 siRNA 处理

HUVEC 或 THP-1 细胞分别培养在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基中。用 PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h,诱导其分化为巨噬细胞表型后用于实验。所有细胞均在 37 °C、5% CO₂、95% 湿度的培养箱中培养。将 HUVEC 分别培养于完全培养基或含有 1 mmol/L

DCA 的完全培养基中以探究 DCA 对 PDK 家族的影响。当 HUVEC 达 80% 汇合度时,在 OptiMEM 中使用 Lipofectamine 3000 转染 50 nmol/L siRNA-NC 或 50 nmol/L siRNA-PDK1,持续 12 h,构建 PDK1 基因敲低模型。随后将转染不同 siRNA 的 HUVEC 暴露于 PBS 或 100 g/L ox-LDL 中,24 h 后进行实验,以探究 PDK1 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤及其功能障碍中的作用。

1.3 DHE 和 mitoSOX™ 染色

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种于 12 孔板,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h,然后于 37 °C 下与 DHE 或 mitoSOX™ 孵育 30 min。使用荧光显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析。

1.4 线粒体膜电位检测

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种于 12 孔板,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h,然后取出细胞培养板,用 PBS 清洗,弃上清液,将细胞与 500 μL JC-1 于 37 °C 和 5% CO₂ 条件下孵育 15 min。使用荧光显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析。

1.5 Transwell 实验

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种到 Transwell 小室的上室,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h,移除小室,并在室温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min,随后在室温下用结晶紫染色 15 min;用棉签轻轻擦拭上室中的 HUVEC,从 3 个随机选择的区域使用显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析。

1.6 流式细胞术检测

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种于 12 孔板,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h,然后使用不含 EDTA 和酚红的胰蛋白酶收集 HUVEC,并与检测试剂盒孵育。标记的细胞通过流式细胞仪进行分析。

1.7 单核细胞黏附实验

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种于 12 孔板,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h;THP-1 细胞在 37 °C 下用 Dil 染色 10 min;将 PBS 洗涤后的 THP-1 细胞接种到 HUVEC 中,于 37 °C、5% CO₂ 气体环境中共培养 4 h,PBS 洗涤 3 次,去除未黏附的 THP-1 细胞,然后从 3 个随机选择的区域使用荧光显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析,计数黏附的 THP-1 细胞。

1.8 单核细胞招募实验

将转染不同 siRNA 的 HUVEC 接种于 Transwell 底部腔室,加入 PBS 或 ox-LDL 培养 24 h;经过诱导分化的 THP-1 细胞(巨噬细胞)则添加到顶部腔室;培养 24 h 后,移除腔室,在室温下用 4% PFA 固定 20 min,然后在室温下用结晶紫染色 15 min;用棉签轻轻擦拭上腔室中的 THP-1 细胞,从 3 个随机选择的区域使用显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析并计数。

1.9 免疫荧光染色实验

采用抗 CD86 和抗 CD206 对与 HUVEC 共培养的 THP-1 细胞进行免疫荧光染色;次日,用 PBS 洗涤后,与特定的二抗孵育;最后,用含 DAPI 的封片介质封片。使用荧光显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行分析。

1.10 RT-qPCR 检测

通过总 RNA 提取试剂盒从 HUVEC 和 THP-1 细胞中提取总 RNA,并反转录获得 cDNA(反应体系 20 μL,反应条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s)。根据说明书,将 cDNA 与 SYBR Green 及扩增所需的引物混合(反应体系 20 μL,反应条件:Step1 预变性:95 °C 30 s;Step2 变性:95 °C 5 s;退火/延伸:60 °C 30 s),共 40 个循环。应用 2^{-ΔΔCt} 公式计算各目的基因 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
PDK1	AATCACCAGGACAGCCAATACA	CCAGCGTGACATGAACCTGAA
NLRP3	TGGGTTTACTGGAGTACCTTTGG	GTAGCGTTTGTGAGGCTCACA
IL-18	CACCCCGGACCATATTTATTATAAGT	TGTTATCAGGAGGATTCATTTTCCTT
IL-1β	CTGAGCACCTTCTTTCCCTTCA	TGGACCAGACATCACCAAGCT
ICAM-1	CACAGTCACCTATGGCAACGA	GGAAAGCTGTAGATGGTCACTGTCT
VCAM-1	TTTGACAGGCTGGAGATAGACT	TCAATGTGTAATTTAGCTCGGCA
MCP-1	TGGCTCAGCCAGATGCAAT	TGGCCACAATGGTCTTGAAG
iNOS	TTTGATGTCCGAGGCAAACA	GAACACGTTCTTGGCATGCA
Arg-1	CAGTCGTGGGAGGTCTGACATAC	CTGCTGTGTTCACTGTTCCAGTT
CD86	TCTATACACGGTTACCCAGAACCTAA	AGGGAATGAAACAGACAAGCTGAT
CD206	GGGTTGCTATCACTCTCTATGC	TTTCTTGTCTGTTGCCGTAGTT
GAPDH	CATGTTCCGTCATGGGTGTGAA	GGCATGGACTGTGCTCATGAG

注:iNOS:诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase);Arg-1:精氨酸 1(arginine-1)。

1.11 Western blot 检测

使用 RIPA 裂解缓冲液从处理后的 HUVEC 中提取总蛋白。将 35 ~ 40 μg 的蛋白质通过 10% ~ 15% 的 SDS-PAGE 凝胶分离,转膜,封闭处理后,加一抗稀释液[NF- κB p65(1 : 1 000)、IL-1 β (1 : 1 000)、PDK2(1 : 1 000)、PDK4(1 : 1 000)、PDK1(1 : 1 000)、p-NF- κB p65(1 : 1 000)、NLRP3(1 : 1 000)、IL-18(1 : 1 000)、MCP-1(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 1 0000)],于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜后加 IgG 二抗稀释液(1 : 3 000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜后加 ECL 显色。应用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,然后以 GAPDH 为内参计算各目的蛋白相对表达水平。

1.12 促炎细胞因子的测定

根据制造商的操作说明,使用 ELISA 试剂盒检测细胞培养基中 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、IL-1 β 和 IL-18 的水平。

1.13 MDA 含量和 SOD 活性的测定

经 siRNA 与 PBS 或 ox-LDL 处理后,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测量 HUVEC 中的蛋白含量。按照制造商的操作说明,测定细胞培养基和 HUVEC 中的

MDA 含量和 SOD 活性。

1.14 统计学分析

所有数据均使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。正态分布计量资料多组间比较采用单因素方差分析,非正态分布计量资料组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 增加 HUVEC 中 PDK1 的表达

Western blot 检测结果显示,与 CON 组相比,DCA 对 PDK1 的抑制作用比对 PDK2 和 PDK4 的抑制作用更明显(均 $P < 0.05$);CON+PBS 组与 NC+PBS 组相比,PDK1 的表达无明显变化($P > 0.05$);经 ox-LDL 处理后,PDK1 的表达升高($P < 0.01$)。通过 Western blot 和 RT-qPCR 对 siRNA 基因沉默效率进行评估,与 NC+PBS 组相比,siRNA-PDK1 转染后 HUVEC 中的 PDK1 mRNA 和蛋白降低(均 $P < 0.05$;图 1)。

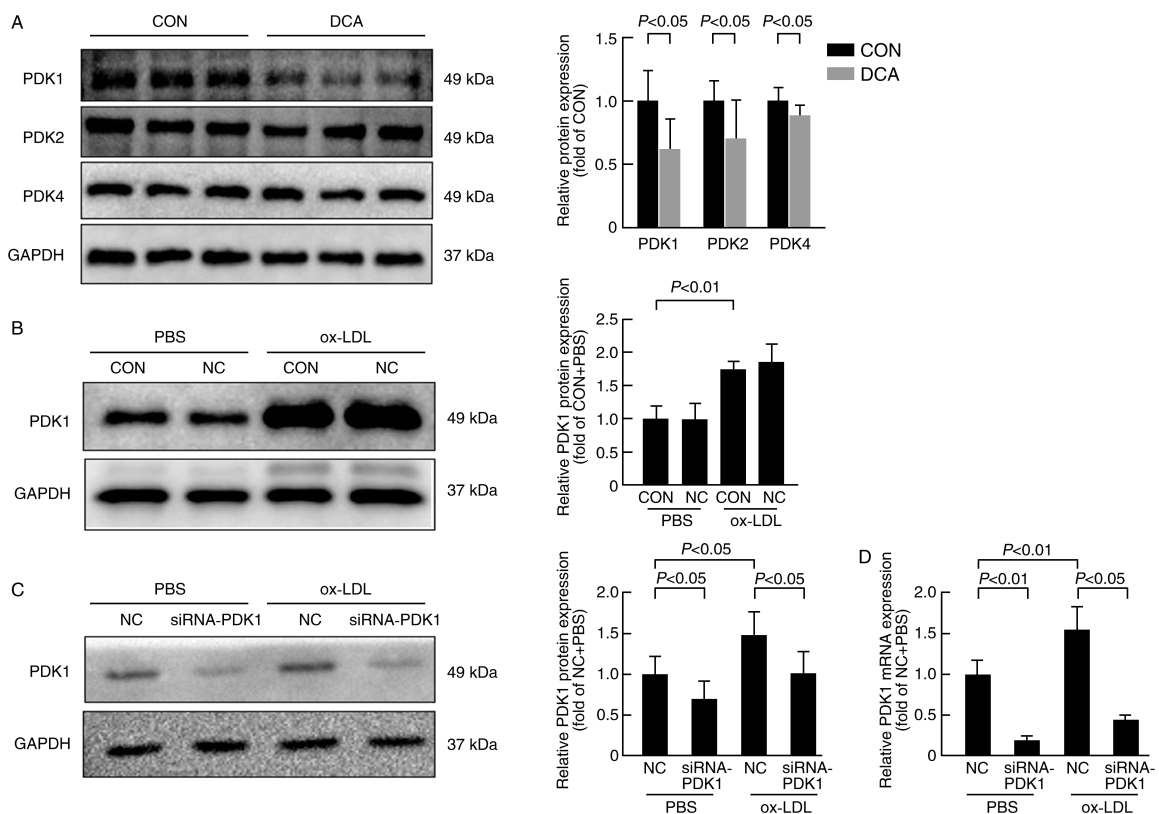


图 1. ox-LDL 处理 HUVEC 后 PDK1 的表达变化

A: DCA 处理 HUVEC 后, Western blot 检测 PDK1、PDK2、PDK4 表达及定量分析图($n=3$); B: siRNA-NC 和 ox-LDL 处理 HUVEC 后, Western blot 检测 PDK1 表达及定量分析图($n=3$); C: siRNA-PDK1 和 ox-LDL 处理 HUVEC 后, Western blot 检测 PDK1 表达及定量分析图($n=3$); D: siRNA-PDK1 和 ox-LDL 处理 HUVEC 后, RT-qPCR 检测 PDK1 mRNA 表达($n=3$)。

Figure 1. Expression changes of PDK1 after ox-LDL treatment of HUVEC

2.2 敲低 PDK1 降低 HUVEC 募集和黏附 THP-1 细胞的能力

结晶紫染色实验结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,迁移进入 Transwell 小室的下室 THP-1 细胞数量减少 ($P < 0.05$)。Dil 染色结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,黏附的 THP-1 细胞数量减少 ($P <$

0.05)。Western blot 检测结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,MCP-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 和 ELISA 检测结果显示,与 NC 组+ox-LDL 相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达降低,细胞培养基上清液中 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量减少 (均 $P < 0.05$; 图 2)。

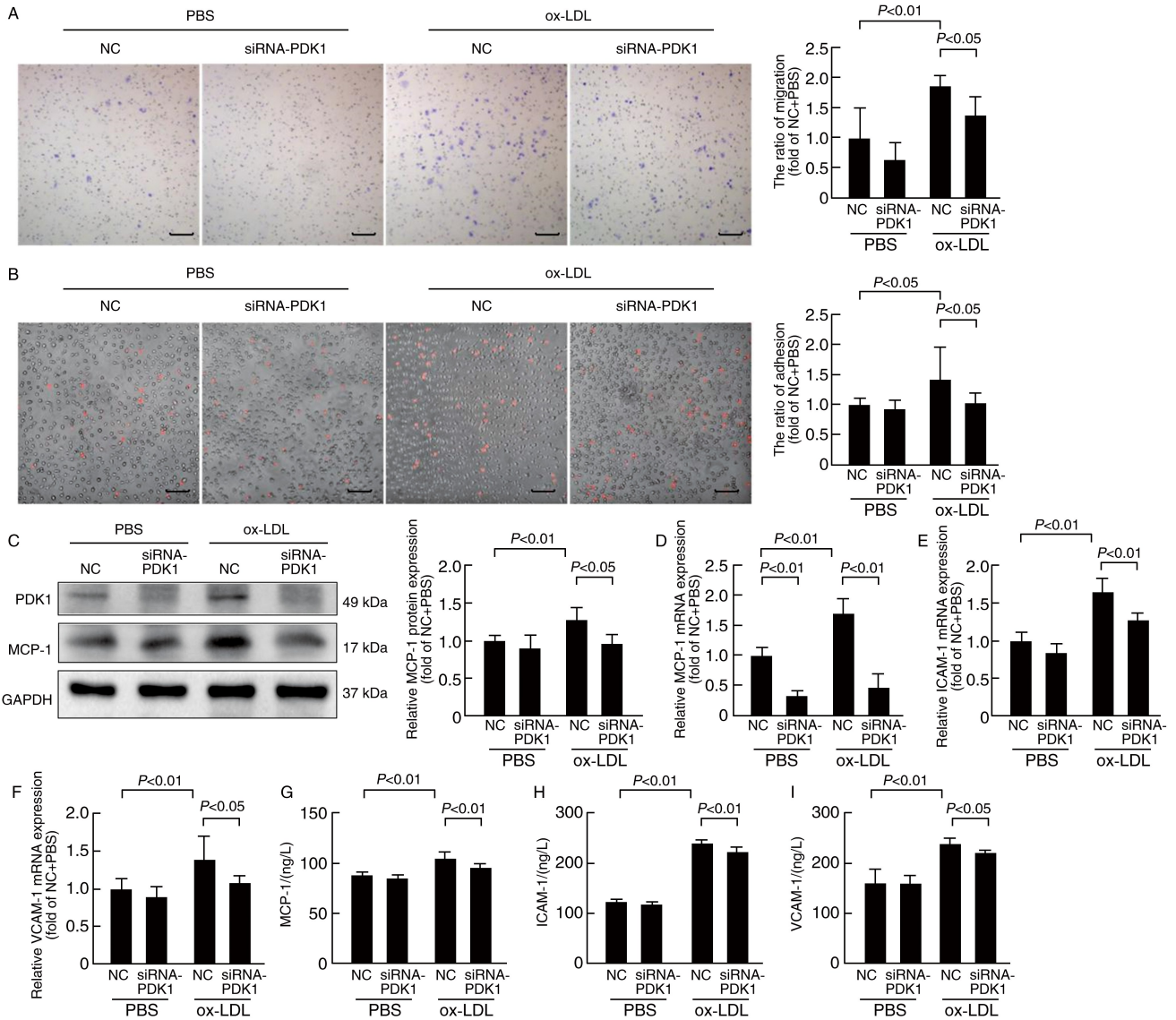


图 2. 敲低 PDK1 对 HUVEC 募集和黏附 THP-1 细胞能力的影响

A: 在 HUVEC 与 THP-1 细胞共培养体系中,THP-1 细胞的迁移能力检测及定量分析图 ($n=3$);B: 在 HUVEC 与 THP-1 细胞共培养体系中,THP-1 细胞的黏附能力检测及定量分析图 ($n=3$);C: ox-LDL 处理 HUVEC 后,Western blot 检测 MCP-1 表达及定量分析图 ($n=3$);D-F: ox-LDL 处理 HUVEC 后,RT-qPCR 检测 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达 ($n=3$);G-I: ELISA 检测 HUVEC 培养基上清液中 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 的含量 ($n=10$)。比例尺为 200 μm 。

Figure 2. Effects of knocking down PDK1 on the recruitment and adhesion ability of HUVEC to THP-1 cells

2.3 敲低 PDK1 对共培养体系中 THP-1 细胞极化的影响

免疫荧光染色结果显示,与 NC+ox-LDL 组相

比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,THP-1 细胞中的 CD86 荧光强度减弱 ($P < 0.01$),CD206 荧光强度增加 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 结果显示,与 NC+ox-LDL

组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,THP-1 细胞中的 CD86、iNOS mRNA 表达减少,而 CD206 和 Arg-1 mRNA 表达增加(均 $P < 0.05$; 图 3)。

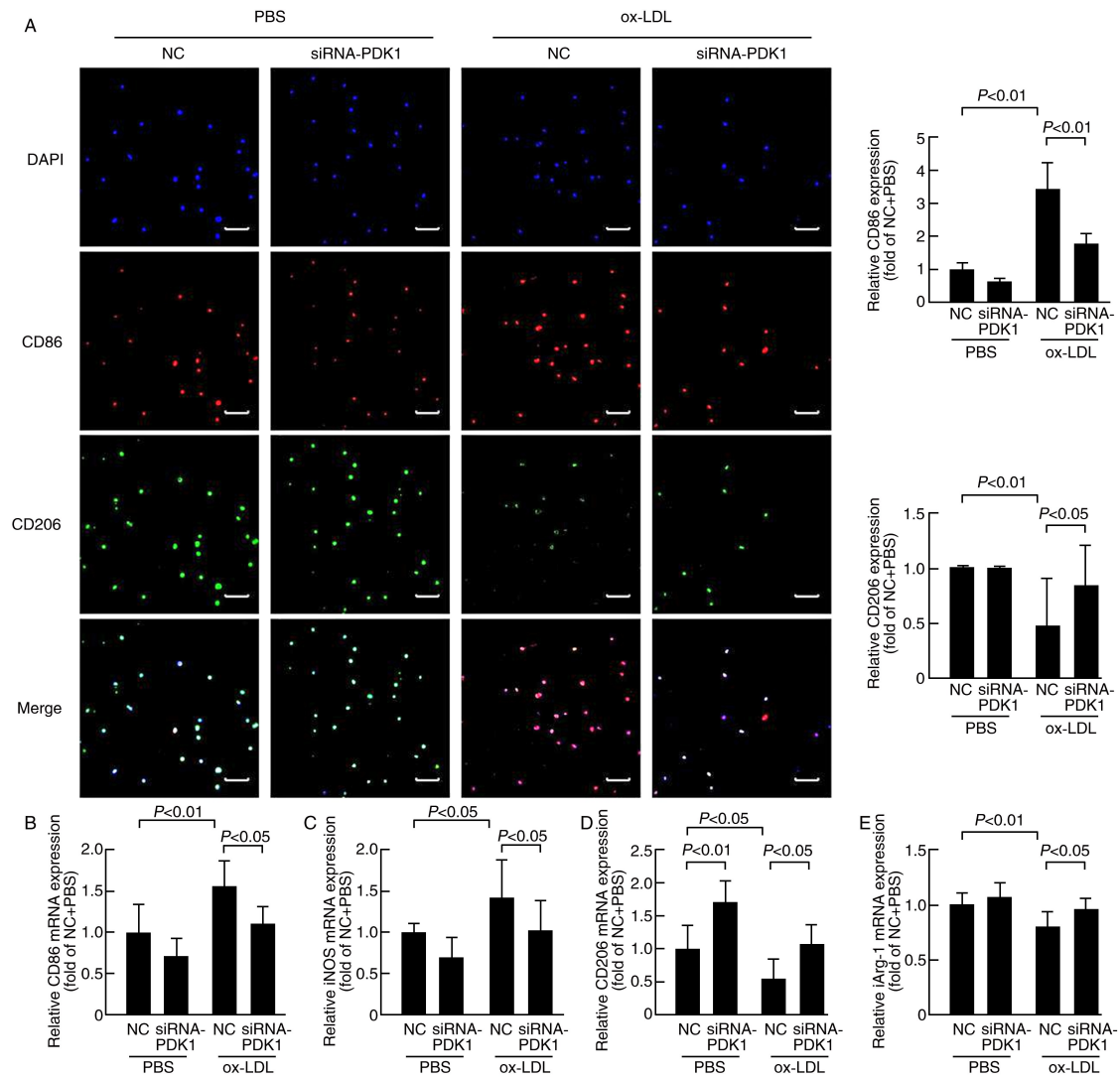


图 3. 敲低 PDK1 对共培养体系中 THP-1 细胞极化的影响

A: 在 HUVEC 与 THP-1 细胞共培养体系中,THP-1 细胞中 CD86 和 CD206 免疫荧光染色图像及定量分析($n=3$);
B-E: 在 HUVEC 与 THP-1 细胞共培养体系中,RT-qPCR 检测 THP-1 细胞中 CD86、iNOS、CD206 和 Arg-1 mRNA 表达($n=3$)。
比例尺为 200 μm 。

Figure 3. Effects of knocking down PDK1 on polarization of THP-1 cells in co-culture system

2.4 敲低 PDK1 减轻 ox-LDL 处理引起的 HUVEC 迁移抑制及凋亡加剧

结晶紫染色实验结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,HUVEC 迁移进入下腔室的数量增加($P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,HUVEC 凋亡率下降($P < 0.05$)。RT-qPCR 检测结果显示,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,Bcl-2 mRNA 表达增加,Bax mRNA 表达降低(均 $P < 0.05$; 图 4)。

2.5 敲低 PDK1 减轻 ox-LDL 处理引起的 HUVEC 氧化应激反应

DHE 和 mitoSOX™ 线粒体超氧化物指示剂染色结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,红色荧光强度降低(均 $P < 0.05$)。JC-1 染色结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,红色荧光强度与绿色荧光强度的比值上升($P < 0.05$)。RT-qPCR 和 ELISA 检测结果显示,与 NC+ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,细胞培养上清液中 SOD 活性增加,MDA 含量降

低(均 $P < 0.05$; 图 5)。

2.6 敲低 PDK1 抑制 ox-LDL 处理引起的 HUVEC NF- κ B 和 NLRP3 信号通路的激活

Western blot 检测结果显示,与 NC + ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,NF- κ B p65 磷酸化水平下降,NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的表达水平降

低(均 $P < 0.05$)。RT-qPCR 检测结果显示,与 NC + ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达降低(均 $P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示,与 NC + ox-LDL 组相比,敲低 HUVEC 中的 PDK1 后,细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的含量减少(均 $P < 0.01$; 图 6)。

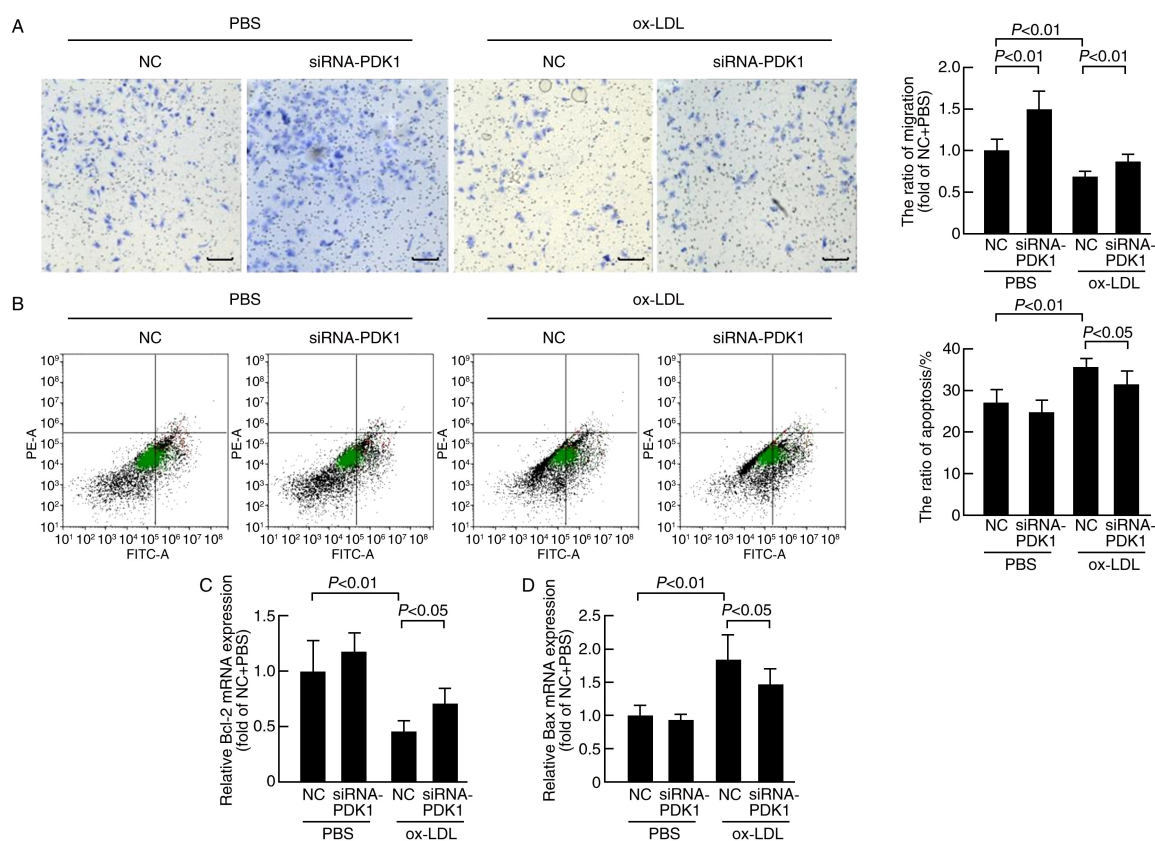


图 4. 敲低 PDK1 对 HUVEC 迁移与凋亡的影响

A: ox-LDL 处理 HUVEC 后,结晶紫染色图像及定量分析($n=3$); B: ox-LDL 处理 HUVEC 后,流式细胞术检测图像及定量分析($n=3$);

C-D: ox-LDL 处理 HUVEC 后,RT-qPCR 检测 Bax 与 Bcl-2 mRNA 表达($n=3$)。比例尺为 200 μ m。

Figure 4. Effects of knocking down PDK1 on migration and apoptosis of HUVEC

3 讨论

缓解内皮细胞氧化应激和炎症反应对于改善内皮细胞功能,以及预防动脉粥样硬化具有重要意义^[15-16]。PDK1 作为 PDK 家族的重要组成部分,与心血管疾病密切相关,但 PDK1 是否可以作为动脉粥样硬化早期诊断标志物以及新的治疗靶点,仍需要观察其在内皮细胞功能障碍中的作用^[1,17-18]。本研究发现,抑制内皮细胞 PDK1 的表达,可通过抑制氧化应激以及 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路激活的双重途径,减轻内皮细胞功能障碍,这是防治动脉粥样硬化的关键机制,为治疗心血管疾病提供了新视角。

在本研究中,经 ox-LDL 处理后,HUVEC 中的 PDK1 表达显著上调;此外,作为潜在降脂药物的 DCA 对 PDK1 的抑制作用相较于 PDK2、PDK4 更为显著,这表明 PDK1 在动脉粥样硬化的治疗中具备更大的应用潜力。ROS 的过量积累,会损害细胞的结构与功能,致使线粒体膜电位显著降低,造成血管内皮细胞迁移能力减弱和细胞凋亡加剧,严重影响血管内皮细胞功能,进而引发动脉粥样硬化^[19-21]。SOD 活性和 MDA 含量的失衡反映细胞抗氧化能力降低和氧化损伤程度加重。本研究发现,抑制 HUVEC 中 PDK1 的表达,能够有效减少 ox-LDL 处理所引起的 ROS 生成,改善异常的线粒体膜电位,保护线粒体功能。同时,还可增强 SOD 活性,降

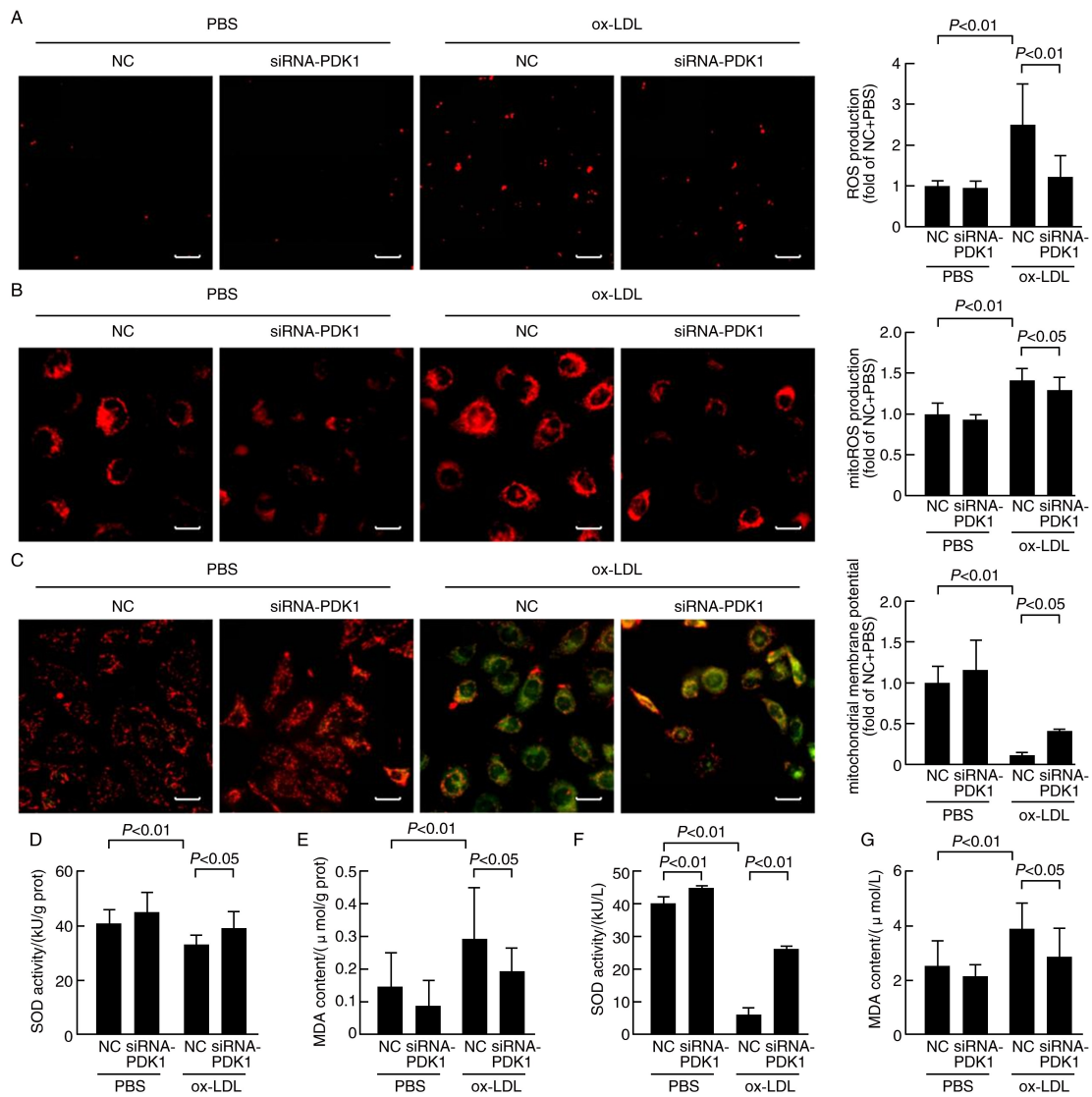


图5. 敲低 PDK1 对 ox-LDL 处理引起的 HUVEC 氧化应激反应的影响

A: ox-LDL 处理 HUVEC 后, DHE 染色图像及定量分析 ($n=3$), 比例尺为 200 μ m; B: ox-LDL 处理 HUVEC 后, mitoSOX 染色图像及定量分析 ($n=3$), 比例尺为 50 μ m; C: ox-LDL 处理 HUVEC 后, JC-1 染色图像及定量分析 ($n=3$), 比例尺为 50 μ m; D-E: ox-LDL 处理 HUVEC 后, SOD 活性和 MDA 含量测定 ($n=10$); F-G: ox-LDL 处理 HUVEC 后, 细胞培养上清液中 SOD 活性和 MDA 含量测定 ($n=10$)。

Figure 5. Effects of knocking down PDK1 on oxidative stress response of HUVEC induced by ox-LDL treatment

低 MDA 含量。这表明抑制 PDK1 能够缓解经 ox-LDL 处理引发的 HUVEC 氧化应激损伤, 有效恢复被 ox-LDL 损伤的 HUVEC 迁移能力, 并抑制由 ox-LDL 引发的 HUVEC 凋亡。综上所述, 本研究表明, 敲低 PDK1 可有效减轻 ox-LDL 引发的氧化应激, 进而恢复 HUVEC 的迁移能力, 抑制其凋亡, 改善其功能障碍。

抑制血管内皮细胞产生的趋化信号对于缓解血管炎症反应具有重要意义^[22]。本研究发现, 经 ox-LDL 处理后, HUVEC 对共培养体系中 THP-1 细胞的募集与黏附作用, 以及 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1

的产生与分泌均显著增加; 同时, 共培养体系中 THP-1 细胞的 M1 极化标志基因 (如 CD86、iNOS) 显著增多, M2 极化标志基因 (如 CD206、Arg-1) 显著减少; 而敲低 HUVEC 中的 PDK1 可有效逆转上述过程。NLRP3 炎症小体的异常活化释放的 IL-1 β 和 IL-18 在诱导巨噬细胞极化为 M1 表型中起到重要作用^[22-24], NF- κ B 信号通路与 NLRP3 炎症小体之间存在着串扰^[25], 同时 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 都被认为是 NF- κ B 的下游调控因子。以上研究显示, PDK1 通过抑制 NF- κ B p65 的磷酸化, 抑制了 NF- κ B 信号通路的活化, 并调控 NLRP3 炎症小体的激活。

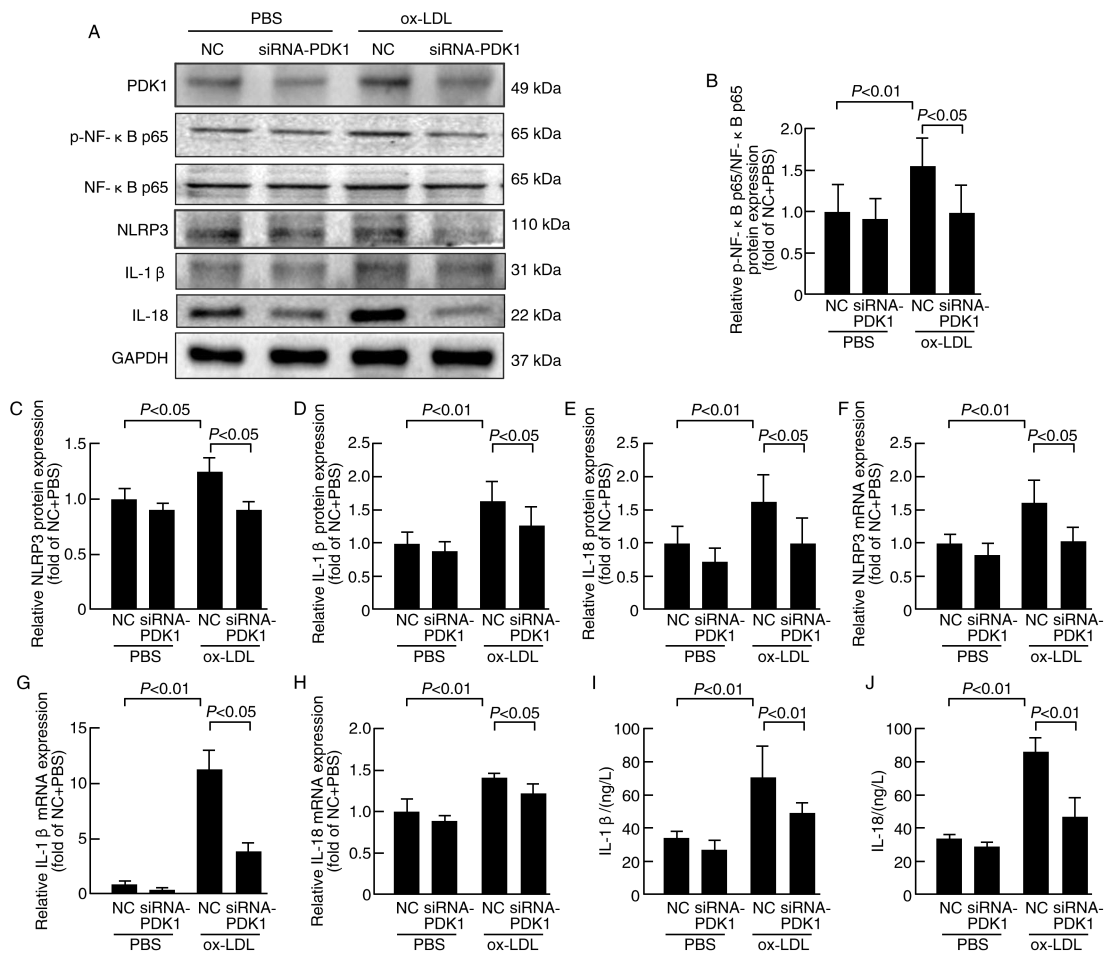


图 6. PDK1 通过 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路调节 ox-LDL 处理引起的 HUVEC 炎症反应

A-E: ox-LDL 处理 HUVEC 后, Western blot 检测 PDK1、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的表达及定量分析图 ($n=3$);

F-H: ox-LDL 处理 HUVEC 后, RT-qPCR 检测 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达 ($n=3$); I-J: ELISA 检测细胞培养上

清液中 IL-1 β 和 IL-18 的含量 ($n=10$)。

Figure 6. PDK1 regulated ox-LDL-induced inflammatory response of HUVEC via NF- κ B and NLRP3 signaling pathways

因此,本研究认为,敲低 PDK1 能够抑制 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路的激活,降低 HUVEC 募集并黏附 THP-1 细胞的能力,使 THP-1 细胞的 CD86 和 iNOS 表达减少,CD206 和 Arg-1 表达增加,促使其趋向 M2 极化。

综上所述,本研究认为 PDK1 通过参与氧化应激与炎症反应的交叉机制,加剧内皮功能障碍,进而对动脉粥样硬化产生影响。本研究阐明了 PDK1 参与了血管内皮细胞的氧化应激过程,以及 NF- κ B 和 NLRP3 信号通路的激活。降低 PDK1 的表达能够有效恢复血管内皮细胞的生物学功能,这为将 PDK1 作为动脉粥样硬化的治疗靶点提供了全新的思路。

[参考文献]

[1] XING C, JIANG Z, WANG Y. Downregulation of NAGLU

in VEC increases abnormal accumulation of lysosomes and represents a predictive biomarker in early atherosclerosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 797047.

[2] AUGUSTIN H G, KOH G Y. A systems view of the vascular endothelium in health and disease [J]. *Cell*, 2024, 187 (18): 4833-4858.

[3] KANG P, DONG P. CircMETTL14 (11) S upregulated METTL14 and induced CXCR4 to aggravate endothelial inflammation and atherosclerosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 126: 110979.

[4] 苑 聪, 罗新园, 熊淑珊, 等. H₂S 拮抗 HUVEC 衰老与促进 SIRT1 巯基化和减少 FOXO1 乙酰化有关 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(9): 746-753.

YUAN C, LUO X Y, XIONG S S, et al. The antagonist role of H₂S against senescence of HUVEC may involve activation of SIRT1 S-sulfhydrylation and reduction of FOXO1

- acetylation [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31 (9): 746-753.
- [5] ZHU L, BAO Y L, LIU Z J, et al. Gualou-Xiebai herb pair ameliorate atherosclerosis in HFD-induced ApoE^{-/-} mice and inhibit the ox-LDL-induced injury of HUVECs by regulating the Nrf2-mediated ferroptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117892.
- [6] LU L Q, LI N S, LI M R, et al. DL-3-n-butylphthalide improves the endothelium-dependent vasodilation in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice via suppressing inflammation, endothelial necroptosis and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175938.
- [7] CHEN S, ZOU Y, SONG C, et al. The role of glycolytic metabolic pathways in cardiovascular disease and potential therapeutic approaches [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118 (1): 48.
- [8] LI C, LIU C, ZHANG J, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase regulates macrophage polarization in metabolic and inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1296687.
- [9] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. PDK4 promotes vascular calcification by interfering with autophagic activity and metabolic reprogramming [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (11): 991.
- [10] DEUSE T, HUA X, WANG D, et al. Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 641-644.
- [11] ZHU X, WANG Y, SOAITA I, et al. Acetate controls endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(7): 1163-1178.
- [12] LIU X, LUO P, ZHANG W, et al. Roles of pyroptosis in atherosclerosis pathogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115369.
- [13] STACPOOLE P W, MOORE G W, KORNHAUSER D M. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia [J]. *N Engl J Med*, 1978, 298(10): 526-530.
- [14] TIERSMA J F, EVERS B, BAKKER B M, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase inhibition by dichloroacetate in melanoma cells unveils metabolic vulnerabilities [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3745.
- [15] ADKAR S S, LEEPER N J. Efferocytosis in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(11): 762-779.
- [16] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [17] YU M, PAN Q, LI W, et al. Isoliquiritigenin inhibits gastric cancer growth through suppressing GLUT4 mediated glucose uptake and inducing PDHK1/PGC-1 α mediated energy metabolic collapse [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155045.
- [18] FORTEZA M J, BERG M, EDSFELDT A, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase regulates vascular inflammation in atherosclerosis and increases cardiovascular risk [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(7): 1524-1536.
- [19] BEN AMMAR R, MOHAMED M E, ALFWUAIRES M, et al. Anti-inflammatory activity of geraniol isolated from lemon grass on ox-LDL-stimulated endothelial cells by up-regulation of Heme oxygenase-1 via PI3K/Akt and Nrf-2 signaling pathways [J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4817.
- [20] GIORDO R, POSADINO A M, MACCIOCCU P, et al. Sera from rheumatoid arthritis patients induce oxidative stress and pro-angiogenic and profibrotic phenotypes in human endothelial cells [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(19): 5913.
- [21] LIU H, FU M, REN Z, et al. Cadmium exposure induces inflammation, oxidative stress and DNA damage in HUVEC and promotes THP-1 adhesion: a possible mechanism on the formation of atherosclerotic plaque [J]. *Toxicology*, 2025, 511: 154046.
- [23] BEGUM E, MAHMUD M R, RAHMAN M M, et al. IL-18 blockage reduces neuroinflammation and promotes functional recovery in a mouse model of spinal cord injury [J]. *Biomolecules*, 2024, 15(1): 16.
- [22] WANG L H, GU Z W, LI J, et al. Isorhynchophylline inhibits inflammatory responses in endothelial cells and macrophages through the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 80.
- [24] MEYERS A K, WANG Z, HAN W, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase supports macrophage NLRP3 inflammasome activation during acute inflammation [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 111941.
- [25] LI Z, HUANG Z, ZHANG H, et al. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- κ B/NLRP3 crosstalk [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8868361.

(此文编辑 文玉珊)