

琥珀酸通过活性氧途径诱导人脐静脉内皮细胞焦亡

章舒蕾, 梁亚敏, 罗涔方, 危当恒

(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, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 琥珀酸; 人脐静脉内皮细胞; 线粒体; 活性氧; 焦亡; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨琥珀酸对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)焦亡的影响及其调控机制。方法 用琥珀酸类似物琥珀酸二乙酯(DS)处理 HUVEC 24 h, 比色法检测细胞内琥珀酸含量, Western blot 检测细胞焦亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (Caspase-1)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-18、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、消皮素 D N 端 (GSDMD-N) 的含量; ATP 测定试剂盒以及活性氧 (ROS) 荧光探针分别检测琥珀酸对 HUVEC 的 ATP 以及 ROS 生成的影响。ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 检测 ROS 在琥珀酸诱导 HUVEC 焦亡中的作用。琥珀酸氧化抑制剂丙二酸二甲酯 (DMM) 检测琥珀酸氧化代谢对 ROS 产生的影响。结果 DS 促 HUVEC 内琥珀酸蓄积, 上调焦亡相关蛋白 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GSDMD-N 和 NLRP3 的表达, 抑制 ATP 生成并上调 ROS 产生。NAC 抑制琥珀酸诱导的 ROS 生成, 并下调上述焦亡相关蛋白的表达。DMM 下调琥珀酸诱导的 ROS 产生以及 HUVEC 的焦亡。结论 琥珀酸通过氧化代谢上调 ROS 生成, 进而促进 HUVEC 焦亡。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Succinate induces pyroptosis of human umbilical vein endothelial cells via reactive oxygen species pathway

ZHANG Shulei, LIANG Yamin, LUO Cenfang, WEI Dangheng

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] succinate; human umbilical vein endothelial cell; mitochondria; reactive oxygen species; pyroptosis; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of succinate on pyroptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its regulatory mechanism. **Methods** HUVECs were treated with succinate analogue diethyl succinate (DS) for 24 h, and the content of succinate was detected by colorimetry. Western blot was used to detect the expressions of pyroptosis-related protein cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (Caspase-1), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin D N terminus (GSDMD-N). The effects of succinate on ATP and reactive oxygen species (ROS) production of HUVEC were detected by ATP assay kit and ROS fluorescent probe. ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) was used to observe the role of ROS in HUVEC pyroptosis induced by succinate. Dimethyl malonate (DMM), a succinate oxidation inhibitor, was used to detect the effect of succinate oxidative metabolism on ROS production. **Results** DS promoted the accumulation of succinate in HUVEC, up-regulated the expressions of pyroptosis-related proteins Caspase-1, IL-1 β , IL-18, GSDMD-N and NLRP3, inhibited ATP production and up-regulated ROS production. NAC inhibited the production of ROS induced by succinate and down-regulated the expressions of above pyroptosis-related proteins. DMM down-regulated succinate-induced ROS production and HUVEC pyroptosis. **Conclusion** Succinate up-regulates ROS production through oxidative metabolism, thus promoting HUVEC pyroptosis.

[收稿日期] 2020-08-28

[修回日期] 2020-10-27

[基金项目] 国家自然科学基金(31670962, 81370378); 湖南省卫健委临床重大专项(20200011-1003); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(S201910555137)

[作者简介] 章舒蕾, 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 为 1029645492@qq.com。通信作者危当恒, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail 为 759353094@qq.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)为慢性炎症性病理过程,血管内皮细胞炎性活化为 As 发生发展过程的重要环节^[1]。近来的研究发现,三羧酸循环中间体及其衍生物通过“非能量代谢途径”调控细胞功能并参与 As 的发生发展进程^[2]。琥珀酸为三羧酸循环重要的中间代谢产物,其促进炎症因子的释放以及血管内皮细胞的损伤^[3]。琥珀酸上调小鼠骨髓来源的树突状细胞白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的表达^[4]。高糖通过琥珀酸/G 蛋白偶联受体 91 (G-protein coupled receptor 91, GPR91) 信号促进血管紧张素 II 释放,损伤人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)^[5]。Koenis 等^[6]发现 Nur77 敲除促 As 病变,该模型小鼠血清琥珀酸水平明显增加,并且 Nur77^{-/-}的巨噬细胞中琥珀酸大量积蓄,但琥珀酸积蓄与血管内皮细胞炎性活化间关系尚不清楚。

血管内皮细胞焦亡(炎性、程序性细胞死亡)发生于 As 进程,并与 As 的稳定性密切相关^[7]。在焦亡过程中, Nod 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体被活化,半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (cysteinyl aspartate specific proteinase 1, Caspase-1) 前体蛋白被激活,并介导 IL-1 β 和 IL-18 的加工和成熟、活化及裂解消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)。此外, Pro-Caspase-1 还能直接裂解 GSDMD 触发焦亡,参与血管内皮细胞的损伤以及炎性活化^[8-9]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞焦亡重要的诱导分子, Koenis 等^[6]发现琥珀酸大量蓄积的 Nur77^{-/-}巨噬细胞伴随有大量的 ROS 产生。因此,本文采用外源性的琥珀酸类似物观察琥珀酸对血管内皮细胞 ROS 产生以及焦亡的影响,以探讨琥珀酸对血管内皮细胞炎性活化的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂

HUVEC 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所,琥珀酸二乙酯(diethyl succinate, DS)、丙二酸二甲酯(dimethyl malonate, DMM)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)购自 TCI(上海)化成工业发展有限公司,琥珀酸比色测定试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司,DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司,ATP 测定试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所,ROS 检测荧光探针二氢乙啶

(dihydroethidium, DHE) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自中国上海康为世纪生物科技有限公司,消皮素 D N 端(GSDMD-N)、IL-1 β 、GAPDH、Caspase-1、NLRP3 抗体购自美国 Proteintech 公司,IL-18 抗体购买于美国 GeneTex 公司。

1.2 HUVEC 培养与处理

HUVEC 采用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养,加入琥珀酸类似物 DS(可显著增加胞质和线粒体基质中的琥珀酸),DS 的终浓度为 10 mmol/L; 2.5 mmol/L NAC 预处理 3 h 后加入 DS 处理 24 h,观察 ROS 对 DS 诱导的血管内皮细胞焦亡的影响; DMM 预处理 6 h 后加入 DS 处理 24 h,观察琥珀酸氧化代谢途径对血管内皮细胞 ROS 产生以及焦亡的影响,DMM 的浓度 10 mmol/L。

1.3 BCA 蛋白定量法

按照说明书处理样品,用酶标仪在 562 nm 波长处测定并记录吸光度,根据标准曲线计算样品中蛋白浓度。

1.4 ATP 含量测定

将收集好的细胞加入 90~100 °C 双蒸水,置于热水浴(90~100 °C)中将其匀浆破碎,后将细胞悬液于沸水浴中加热 10 min,取出细胞悬液用 1 mL 移液枪混匀 1 min。然后按照说明书加试剂,最后混匀,常温静置 5 min。检测波长为 636 nm,光径为 0.5 cm,双蒸水调零,测定各管吸光度值,保存并分析结果。

1.5 ROS 荧光探针 DHE 检测

从培养箱中取出处理好的细胞,用 PBS 洗 3 次。加入终浓度为 50 μ mol/L 的 DHE 液,在 37 °C 水浴箱避光条件下孵育 45 min, PBS 清洗细胞 3 次,每次 6 min。荧光显微镜拍照,保存并分析结果。

1.6 Western blot 检测蛋白的表达

收集细胞,使用预冷的 PBS 洗 3 次,加入裂解液后 4 °C 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清后采用 BCA 法进行蛋白定量。目的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入单克隆抗体 GSDMD (1:1 000)、IL-1 β (1:1 000)、IL-18 (1:1 000)、Caspase-1 (1:1 000)、NLRP3 (1:1 000)、GAPDH (1:2 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min,相应二抗室温孵育 2 h, ECL 发光试剂显色,拍照并保存结果。

1.7 琥珀酸含量测定

收集细胞,在冰中快速匀浆,加入 100 μ L 低温

琥珀酸测定缓冲液,以 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。采用琥珀酸比色测定试剂盒,加入各反应物,在 37 °C 下避光孵育 30 min,450 nm 波长处测定吸光度。

1.8 统计学方法

所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 Image Pro Plus、GraphPad Prism 5 统计软件进行数据分析,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 琥珀酸促 HUVEC 焦亡

为了探讨琥珀酸对血管内皮细胞焦亡的影响,

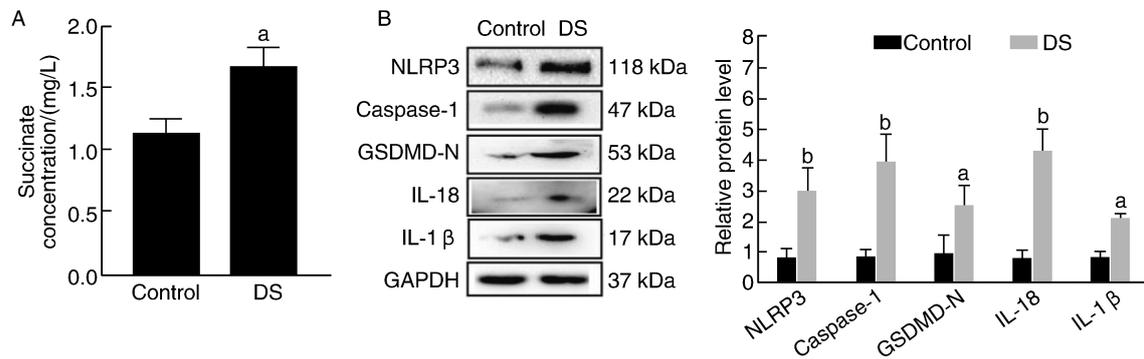


图 1. 琥珀酸促 HUVEC 焦亡 ($n=3$)

A 为 DS 促 HUVEC 内琥珀酸蓄积;B 为 DS 处理 HUVEC 24 h,Western blot 检测焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18 以及 IL-1β 的表达。a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与 Control 组比较。

Figure 1. HUVEC pyroptosis promoted by succinate ($n=3$)

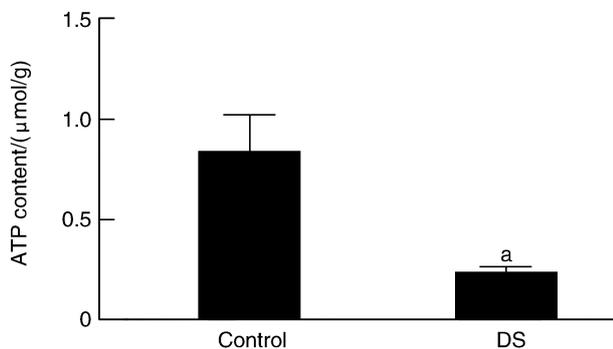


图 2. 琥珀酸对 HUVEC 线粒体 ATP 生成的影响 ($n=3$)
a 为 $P < 0.01$,与 Control 组比较。

Figure 2. Effect of succinate on mitochondrial ATP production in HUVEC ($n=3$)

2.3 琥珀酸增加 HUVEC 的 ROS 水平

随后,我们采用荧光探针检测琥珀酸对 ROS 的影响,结果表明 DS 显著增加 HUVEC 的 ROS 水平(图 3)。

首先观察了琥珀酸的类似物 DS 处理 24 h 后血管内皮细胞内琥珀酸含量,结果显示 DS 明显增加血管内皮细胞内琥珀酸含量(图 1A)。然后 Western blot 检测了 DS 对血管内皮细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-18 以及 IL-1β 蛋白表达的影响,结果表明 DS 上调 NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-18 以及 IL-1β 的表达(图 1B)。这些结果表明细胞内琥珀酸蓄积促焦亡。

2.2 琥珀酸抑制 HUVEC 的 ATP 生成

线粒体是细胞的能量工厂,ATP 是维持机体正常生理活动的重要物质。ATP 含量检测的结果表明 DS 抑制 ATP 生成(图 2)。

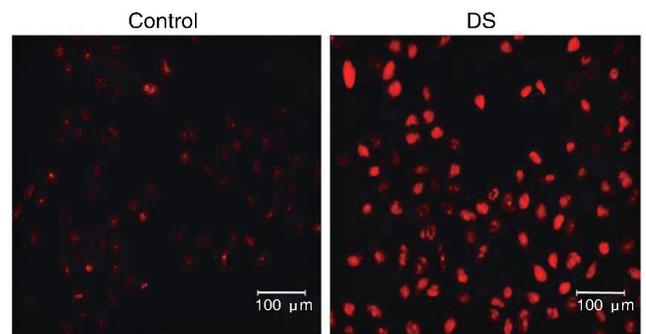


图 3. 琥珀酸增加 HUVEC 的 ROS 水平

Figure 3. Succinate promoted the generation of ROS in HUVEC

2.4 ROS 清除剂 NAC 抑制琥珀酸诱导的 HUVEC 焦亡

为了探讨 ROS 在琥珀酸诱导血管内皮细胞焦亡中的作用,我们采用 ROS 清除剂 NAC(2.5 mmol/L)

预处理血管内皮细胞 3 h,再 DS 孵育 HUVEC,结果表明 NAC 预处理抑制琥珀酸诱导的 ROS 积聚(图

4A),并且抑制琥珀酸诱导的焦亡相关蛋白表达(图 4B)。

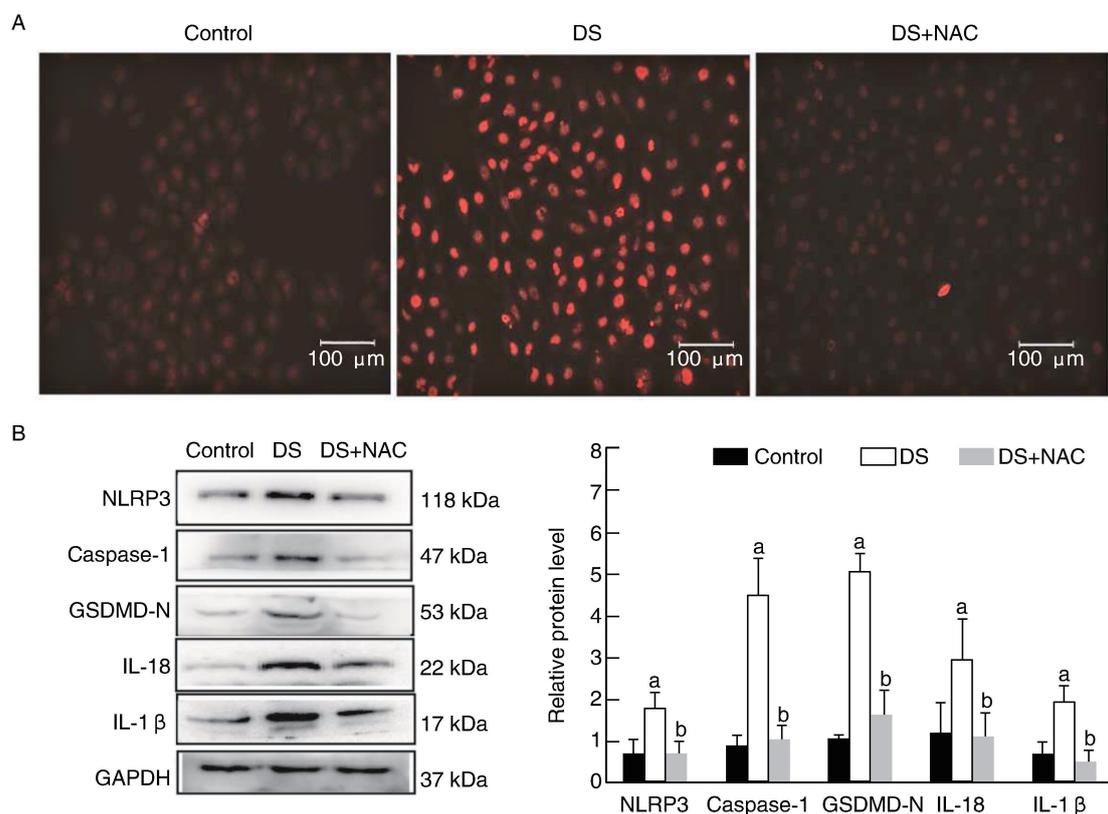


图 4. NAC 抑制琥珀酸诱导的 HUVEC 焦亡 ($n=3$)

A 为 NAC 预处理 3 h 减少琥珀酸诱导的线粒体 ROS 含量;B 为 NAC 减少焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-18 和 IL-1β 的含量。a 为 $P<0.05$,与 Control 组比较;b 为 $P<0.05$,与 DS 组比较。

Figure 4. NAC inhibited HUVEC pyroptosis induced by succinate ($n=3$)

2.5 琥珀酸氧化抑制剂 DMM 抑制琥珀酸诱导的 HUVEC 焦亡

为了进一步探讨琥珀酸促 ROS 生成的机制,我们采用琥珀酸氧化抑制剂 DMM (10 mmol/L) 抑制琥珀酸的氧化。结果表明 DMM 减少血管内皮细胞中 ROS 的积聚(图 5A),焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-18 以及 IL-1β 表达水平降低(图 5B),这些结果表明琥珀酸氧化促进 ROS 的生成进而促 HUVEC 焦亡。

3 讨论

琥珀酸是三羧酸循环中间产物,由琥珀酰辅酶 A 合成酶催化生成。研究发现,琥珀酸通过非能量代谢底物途径参与多种生理和病理过程。琥珀酸上调心肌细胞肥大标志物心房利钠多肽和 p-Akt/t-Akt 的水平,参与右心室肥厚的形成^[10];肿瘤组织

琥珀酸/GPR91 信号靶向 PI3K-HIF-1α 轴介导肿瘤相关巨噬细胞极化和肿瘤转移^[11]。琥珀酸通过 HIF-1α/VEGF 轴诱导类风湿关节炎滑膜血管生成^[12]。我们的研究发现琥珀酸上调血管内皮细胞焦亡标记物的表达,提示细胞内的琥珀酸蓄积促进焦亡。

焦亡是一种新发现的促炎性、程序性细胞死亡方式,在经典的 Caspase-1 依赖性焦亡通路中,活化的 NLRP3 促前体 Caspase-1 成熟,进而剪切 IL-18、IL-1β 和 GSDMD,介导细胞焦亡。Wu 等^[13]发现尼古丁引起血管内皮细胞损伤并诱发焦亡;阿托伐他汀通过 lncRNA NEXN-AS1/NEXN 通路抑制血管内皮细胞焦亡,以非降脂途径保护血管内皮细胞功能^[14]。我们的结果表明,琥珀酸促血管内皮细胞焦亡,提示琥珀酸可能通过焦亡途径引起血管内皮细胞损伤以及炎症活化。

ROS 是细胞焦亡重要的激活分子,介导氧化低

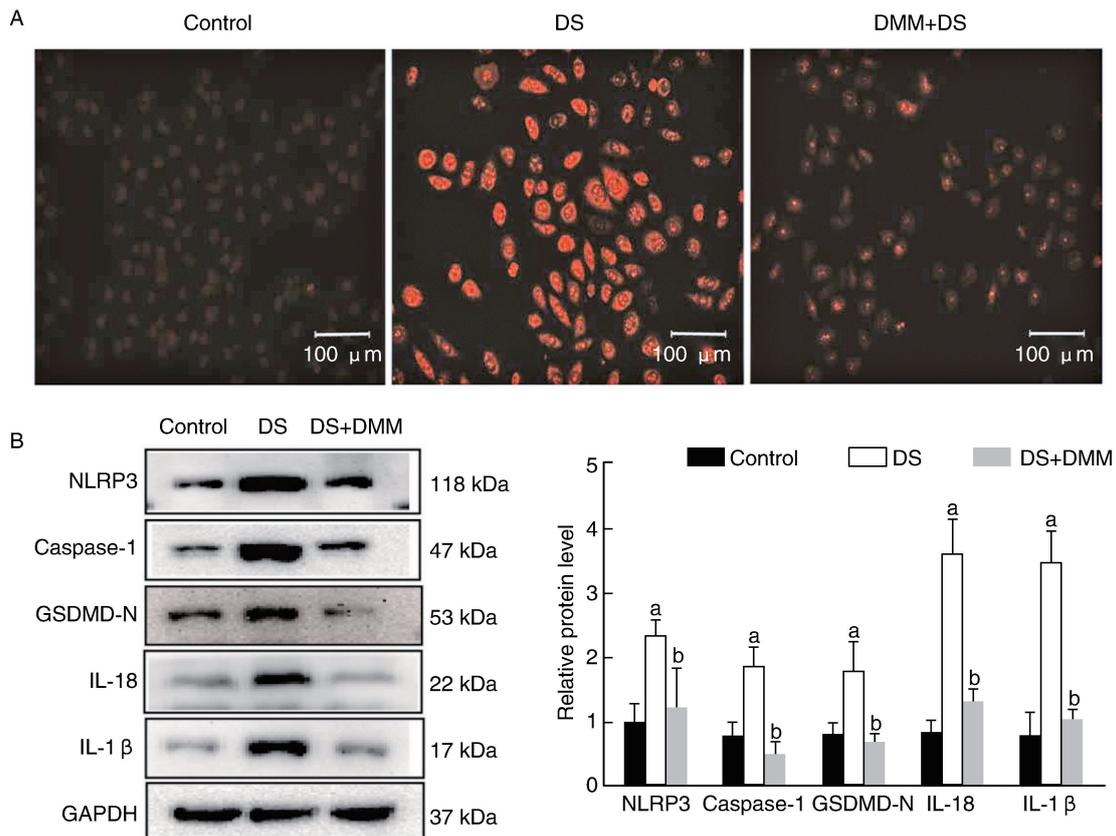


图5. DMM抑制琥珀酸诱导的HUVEC焦亡($n=3$)

A为DMM抑制琥珀酸诱导的ROS产生;B为DMM减少琥珀酸诱导的焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-18和IL-1 β 的含量。a为 $P<0.05$,与Control组比较;b为 $P<0.05$,与DS组比较。

Figure 5. DMM inhibited HUVEC pyroptosis induced by succinate ($n=3$)

密度脂蛋白处理的HUVEC焦亡^[15];肠道菌群代谢产物氧化三甲胺通过激活ROS-TXNIP-NLRP3炎症小体轴诱导炎症和内皮功能损伤^[16]。我们的结果表明琥珀酸类似物DS增加了血管内皮细胞ROS含量,ROS清除剂NAC可降低细胞内ROS含量并下调琥珀酸诱导的血管内皮细胞焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18的表达,表明琥珀酸通过ROS途径促血管内皮细胞焦亡。

细胞内ROS来源于呼吸链以及底物的氧化代谢^[17]。Li等^[18]发现DMM抑制腹膜炎小鼠肿瘤坏死因子的分泌和ROS的产生。在本研究中我们采用琥珀酸脱氢酶抑制剂DMM观察琥珀酸氧化代谢对ROS生成的影响,结果发现DMM明显减少ROS的产生及焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18的表达,表明细胞内琥珀酸通过氧化途径增加ROS的生成和蓄积并促焦亡发生。多位学者研究发现琥珀酸脱氢酶抑制剂DMM通过抑制琥珀酸的氧化代谢改善缺血后再灌注时心、脑、

肾组织损伤^[19-21];Mills等^[22]发现DMM抑制脂多糖诱导的IL-1 β 的产生,抑制炎症反应,提示通过抑制琥珀酸的氧化代谢可以抑制血管内皮细胞焦亡并保护血管内皮细胞功能。

综上所述,琥珀酸通过氧化代谢途径增加ROS的生成,促血管内皮细胞焦亡,但琥珀酸在As发生、发展中的作用有待于进一步的探讨和验证。

[参考文献]

- [1] 李苗,王丽丽,常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8): 730-736.
- [2] Martinez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 102.
- [3] Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(5): 313-320.
- [4] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 beta through HIF-1 alpha[J]. Nature, 2013, 496(7444): 238-242.

- [5] Peti-Peterdi J. High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91 [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(12): 1214-1217.
- [6] Koenis DS, Medzikovic L, van Loenen PB, et al. Nuclear receptor Nur77 limits the macrophage inflammatory response through transcriptional reprogramming of mitochondrial metabolism[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(8): 2127-2140.
- [7] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 28-37.
- [8] He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [9] Xi H, Zhang Y, Xu Y, et al. Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyroptosis in endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1525-1539.
- [10] Yang L, Yu D, Mo R, et al. The succinate receptor GPR91 is involved in pressure overload-induced ventricular hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147597.
- [11] Wu JY, Huang TW, Hsieh YT, et al. Cancer-derived succinate promotes macrophage polarization and cancer metastasis via succinate receptor[J]. *Mol Cell*, 2020, 77(2): 213-227.
- [12] Li Y, Liu Y, Wang C, et al. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 126: 1-14.
- [13] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 171.
- [14] Wu LM, Wu SG, Chen F, et al. Atorvastatin inhibits pyroptosis through the lncRNA NEXN-AS1/NEXN pathway in human vascular endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 293: 26-34.
- [15] Zeng Z, Chen J, Wu P, et al. Ox-LDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7475-7491.
- [16] Wu P, Chen J, Chen J, et al. Trimethylamine N-oxide promotes ApoE^{-/-} mice atherosclerosis by inducing vascular endothelial cell pyroptosis via the SDHB/ROS pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6582-6591.
- [17] Jardim-Messeder D, Caverzan A, Rauber R, et al. Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses[J]. *New Phytol*, 2015, 208(3): 776-789.
- [18] Li Y, Jia A, Wang Y, et al. Immune effects of glycolysis or oxidative phosphorylation metabolic pathway in protecting against bacterial infection [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20298-20309.
- [19] Beach TE, Prag HA, Pala L, et al. Targeting succinate dehydrogenase with malonate ester prodrugs decreases renal ischemia reperfusion injury[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101640.
- [20] Kula-Alwar D, Prag HA, Krieg T. Targeting succinate metabolism in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2019, 140(24): 1968-1970.
- [21] Zhang J, Wang YT, Miller JH, et al. Accumulation of succinate in cardiac ischemia primarily occurs via canonical Krebs cycle activity [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(9): 2617-2628.
- [22] Mills EL, Kelly B, Logan A, et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 457-470.

(此文编辑 曾学清)