

HIF-1 α /BNIP3 通路介导的糖酵解与 氧诱导新生小鼠视网膜血管生成的关系

易 燕,陈斐斐,谭 赞,杜 恒

[武汉市第一医院(武汉市中西医结合医院)儿科,武汉 430030]

摘要 **目的** 基于缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (BNIP3)通路的糖酵解探讨氧诱导新生小鼠视网膜血管生成机制。**方法** 将人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 分为常氧组、缺氧 + si-NC 组、缺氧 + si-HIF-1 α 组和缺氧 + si-HIF-1 α + BNIP3 组。常氧组 HUVECs 暴露于常氧 (21% O₂) 下培养。缺氧 + si-NC 组、缺氧 + si-HIF-1 α 组和缺氧 + si-HIF-1 α + BNIP3 组用 si-NC、si-HIF-1 α 或 si-HIF-1 α 联合 BNIP3 质粒处理 HUVECs 36 h,然后暴露于缺氧 (1% O₂) 下培养。通过免疫荧光、代谢测量、细胞活力、划痕实验、管形成实验考察细胞线粒体自噬、糖酵解以及增殖、迁移和管形成情况。出生后第 7 天的 C57BL/6J 幼鼠随机分配到不同的治疗组:对照组、氧诱导视网膜病变 (OIR) 组、OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组,测量新生血管形成和血管闭塞情况。**结果** 与常氧组比较,缺氧 + si-NC 组 HUVECs 中 LC3 + MitoTracker + 斑点数、葡萄糖摄取和乳酸释放的速率增加 ($P < 0.001$)。与缺氧 + si-NC 组比较,缺氧 + si-HIF-1 α 组 HUVECs 中 LC3 + MitoTracker + 斑点数、葡萄糖摄取和乳酸释放的速率降低 ($P < 0.01$)。与常氧组比较,缺氧 + si-NC 组 HUVECs 在培养第 72 h 的增殖活性降低 ($P < 0.05$),并且伤口愈合面积和管形成数量增加 ($P < 0.01$)。与缺氧 + si-NC 组比较,缺氧 + si-HIF-1 α 组 HUVECs 在培养第 24、48、72 小时的增殖活性降低 ($P < 0.05$),伤口愈合面积、管形成数量降低 ($P < 0.001$)。BNIP3 的过表达逆转了 HIF-1 α 敲低对线粒体自噬、糖酵解以及生物学功能的影响。与 OIR 组比较,OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组小鼠的视网膜组织中新血管形成和血管闭塞区域减少 ($P < 0.05$)。**结论** HIF-1 α /BNIP3 信号通路在低氧条件下促进了 HUVECs 中线粒体自噬激活,其对于内皮功能和血管生成的调控有重要作用。

关键词 缺氧诱导因子-1 α ;新生小鼠;视网膜血管;糖酵解;线粒体自噬;人脐静脉内皮细胞

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0226-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.006

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 的特征是视网膜中病理性血管生成,其是儿童失明的主要原因之一^[1]。内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 在血管生成过程中尤其重要^[2]。研究^[3]发现,缺氧缺血刺激 ECs 的异常增殖和迁移是导致新生血管发芽的主要细胞事件。然而,眼内新生血管 ECs 激活的确切分子机制仍未完全阐明,需要进一步研究。与其他健康细胞类型比较,ECs 具有更高的糖酵解活性,并依赖糖酵解来产生 ATP 和血管发芽^[4]。研究^[5]表明,自噬激活有助于糖酵解的增强。自噬可能为病理性血管生成过程中的代谢重编程提供了一种新的机制^[6-7]。

Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3, BNIP3) 作为响应特定功能障碍线粒体的转录靶标,其表达变化影响糖酵

解代谢的转变^[8-9]。研究^[10]表明,抑制缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)/BNIP3 通路具有视网膜神经保护作用。鉴于 HIF-1 α 作为糖酵解的关键调节因子,该课题组假设 HIF-1 α /BNIP3 通路可能参与介导 ROP 病理性血管生成中自噬和糖酵解途径之间平衡。该研究分析 HIF-1 α /BNIP3 通路介导的自噬在调节代谢转换中的作用,并探讨这种作用对 ECs 增殖、迁移和管形成的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 从美国 ScienCell 研究实验室获得。将 HUVECs 培养在含 5% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 EC 培养基中 (美国 Thermo Scientific 公司),于 37 °C 下,在常氧 (21% O₂) 或缺氧 (1% O₂ 和 94% N₂) 条件下培养 0 ~ 24 h。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 将 HUVECs 分为常氧组、缺氧

2024-10-10 接收

基金项目:湖北省自然科学基金 (编号:2019CFB401)

作者简介:易 燕,女,主治医师,通信作者,E-mail:oylg07@163.com

+ si-NC 组、缺氧 + si-HIF-1 α 组和缺氧 + si-HIF-1 α + BNIP3 组。常氧组 HUVECs 暴露于常氧 (21% O₂) 下培养。缺氧 + si-NC 组、缺氧 + si-HIF-1 α 组和缺氧 + si-HIF-1 α + BNIP3 组分别用 si-NC、si-HIF-1 α 和 si-HIF-1 α 联合 BNIP3 质粒处理 HUVECs 36 h, 然后暴露于缺氧 (1% O₂) 下培养。

1.2.2 细胞转染 pcDNA3-Flag-BNIP3 质粒 (BNIP3) 由上海吉玛制药技术有限公司构建。靶向 HIF-1 α (si-HIF-1 α)、BNIP3 (si-BNIP3) 和阴性对照 (si-NC) 的 siRNA 购自广州市锐博生物科技有限公司。使用 Lipofectamine[®] 2000 试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 将质粒或 siRNA (50 nmol/L) 转染 HUVECs。将转染的 HUVECs 在 37 °C 和 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养 36 h, 然后收集用于进一步实验。siRNA 的序列如下: si-NC 为 5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3'; si-HIF-1 α # 1 为 5'-CUGCCACCAAGCUAGAUAATT-3'; si-HIF-1 α # 2 为 5'-UUAUCUAGCUUGGUGGCAGTT-3'; si-BNIP3 #1 为 5'-UCUUCACACCGUCCUGAAATT-3'; si-BNIP3 #2 为 5'-UUUCAGGACGGUGUGAAGATT-3'。

1.2.3 Western blot 实验 使用 RIPA 裂解缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司) 从 HUVECs 或小鼠视网膜中提取总蛋白。将裂解物在 4 °C 下以 10 000 r/min 离心 15 min 后, 收集上清液, 并使用 BCA 测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 对总蛋白进行定量。通过 10% SDS PAGE 从每个样品中分离等量的蛋白质, 随后转移到聚偏二氟乙烯膜 (美国 Millipore 公司) 上。在室温下用 5% 脱脂乳 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 封闭膜 2 h, 然后在 4 °C 下与一级抗体 (1 : 1 000) 孵育过夜。一级抗体孵育后, 将膜与二级抗体反应 1 h。通过增强化学发光试剂盒检测, 并观察反应带。使用 Image J 软件对条带进行密度定量。使用 GAPDH 蛋白作为内部参考。用于 Western blot 分析的抗体如下: 抗 HIF-1 α (美国 Cell Signaling Technology 公司)、VEGFA (英国 Abcam 公司)、BNIP3 (英国 Abcam 公司) 和 GAPDH (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2.4 免疫荧光染色 为了标记线粒体, 在 37 °C 下将 MitoTracker 红 (500 nmol/L) 加入活 HUVECs 细胞中 30 min, 然后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再用 0.5% Triton X-100 溶液提取 5 min。用含有 1% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭后, 将细胞与抗 LC3B (1 : 500, 英国 Abcam 公司) 一级抗体孵育 1 h。之后, 洗涤细胞并与异硫氰酸荧光素或罗丹明缀合的第二

级抗体 (1 : 3 000, 美国 Jackson Immuno Research 公司) 孵育 1 h, 随后与 DAPI 孵育 3 min。通过倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 拍摄图像。

1.2.5 葡萄糖摄取和乳酸释放测定 使用葡萄糖摄取荧光测定试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 和乳酸比色/荧光测定试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 对培养上清液中的葡萄糖摄取和乳酸产生进行定量。所有原始数据通过显微镜上的血细胞仪测量的细胞密度进行归一化。

1.2.6 代谢测量 使用 Seahorse XFe 96 细胞外流量分析仪 (美国 Seahorse Bioscience 公司) 测定细胞外酸化率 (extracellular acidification rate, ECAR)。HUVECs (1 $\times$ 10⁴ 个细胞/孔) 接种到 Seahorse XF 96 细胞培养板中。在指定的时间点将葡萄糖 (10 mmol/L)、线粒体/ATP 合酶抑制剂寡霉素 (2 μ mol/L) 和糖酵解抑制剂 2-脱氧葡萄糖 (100 mmol/L) 依次注射到每个孔中, 然后进行 3 个测量周期分析。

1.2.7 细胞活力测定 通过 CCK-8 测定法评估 HUVECs 的生存能力。将不同组 (1 000 个细胞/孔) 的 HUVECs 接种到 96 孔板中。在 24、48 和 72 h 时, 将 10 μ l CCK-8 试剂 (上海碧云天生物技术有限公司) 加入每个孔中, 并将板在 37 °C 下再孵育 2 h。使用微孔板分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 在 450 nm 处测量吸光度。

1.2.8 划痕试验 使用伤口愈合测定法分析 HUVECs 的迁移能力。当单层细胞在 6 孔板中达到 100% 汇合时, 使用 20 μ l 无菌移液管尖端来创建伤口。细胞用 1 $\times$ PBS 3 次以去除分离和受损的细胞。然后, 将细胞在无血清 ECM 中在常氧和缺氧条件下孵育。在孵育 0 h 和 24 h 时, 对细胞进行成像, 并使用 Image J 软件使用伤口闭合面积来计算细胞的迁移能力。

1.2.9 试管形成测定 将 Matrigel (美国 BD Biosciences 公司) 等分试样 (150 μ l) 加入 48 孔板中, 并在 37 °C 下孵育 30 min。将细胞 (2 $\times$ 10⁴ 个细胞/孔) 接种到凝胶上。从每个孔中选择 5 个随机场, 并在 8 h 后拍照。使用 Image J 软件测量管状结构的网络。

1.2.10 缺血诱导的视网膜病变小鼠模型 出生后第 7 天的 C57BL/6J 幼鼠及其哺乳母鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物研究经武汉市第一医院伦理委员会批准。参照文献方法诱导氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 模型^[11]。将出生后第 7 天的幼鼠及其哺乳母亲暴露于高氧室 [(75 $\pm$ 2)% O₂] 中 5 d (第 7 ~ 12 天), 以产

生视网膜血管闭塞。在出生后第 12 天时,将小鼠返回到正常室内环境。在此期间,将幼鼠随机分配到不同的治疗组:OIR 组、OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组,每组 6 只。在出生后第 12 天,分别将 si-HIF-1 α 、si-BNIP3 以 0.1 nmol 的剂量分别注射到 OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组幼鼠眼睛的玻璃体腔内。在第 17 天时处死幼鼠。同时,选取 6 只在正常室内环境生长的小鼠作为对照组。

1.2.11 测量新生血管形成与血管闭塞 在第 17 天时处死小鼠并摘取眼球,并在 4℃ 下在 4% 多聚甲醛中固定 1 h。解剖视网膜,并在 4℃ 下用凝集素染色 16 h,以检测血管内皮细胞。用 PBS 洗涤视网膜 2 h,在 4 个象限中从视网膜边缘径向切割。视网膜平面安装后,通过激光共聚焦显微镜捕获图像以观察血管。使用 Image J 软件将血管闭塞和新生血管量化为整个视网膜面积的百分比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。使用 Shapiro-Wilk 检验评估数据的正态分布,正态分布数据表示为 $\bar{x} \pm s$,使用单因素方差分析和事后 Tukey 多重比较检验对来自 3 个或更多组的正态分布数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮细胞缺氧触发因子 HIF-1 α 的激活和

BNIP3 的表达 如图 1A 所示,与常氧组比较,缺氧刺激后 HUVECs 中 HIF-1 α 和 BNIP3 的蛋白水平升高 ($F = 37.46, 18.54$, 均 $P < 0.001$)。为了探索 HIF-1 α 和 BNIP3 之间的潜在调控关系,用 HIF-1 α 或 BNIP3 siRNA 转染 HUVECs。Western blot 分析显示,敲低 HIF-1 α 显著抑制缺氧诱导的 BNIP3 的表达,而 BNIP3 敲低对 HUVECs 中 HIF-1 α 的表达无显著影响,表明 BNIP3 是 HIF-1 α 信号传导的潜在下游靶基因(图 1B)。

2.2 缺氧触发 HUVECs 的自噬流量 鉴于 BNIP3 在线粒体自噬中的调控作用,本研究探讨 HIF-1 α /BNIP3 在缺氧条件下对 HUVECs 线粒体自噬的影响,采用 LC3 与 MitoTracker 荧光共定位检测评估线粒体自噬体的形成。与常氧组比较,缺氧 + si-NC 组 HUVECs 中 LC3 + MitoTracker + 斑点数增加 ($P < 0.001$)。与缺氧 + si-NC 组比较,缺氧 + si-HIF-1 α 组 HUVECs 中 LC3 + MitoTracker + 斑点降低 ($P < 0.01$)。BNIP3 的过表达逆转了 HIF-1 α 敲低对 LC3 + MitoTracker + 斑点数的影响 ($F = 22.37, P < 0.001$)。见图 2。

2.3 HIF-1 α /BNIP3 轴控制缺氧诱导的 HUVECs 糖酵解 将载体(vector)或 BNIP3 过表达质粒共转染到 si-HIF-1 α 处理的 HUVECs 中,观察到转染的 HUVECs 中 BNIP3 水平增加 ($P < 0.001$,图 3A)。与常氧组比较,缺氧 + si-NC 组 HUVECs 中葡萄糖

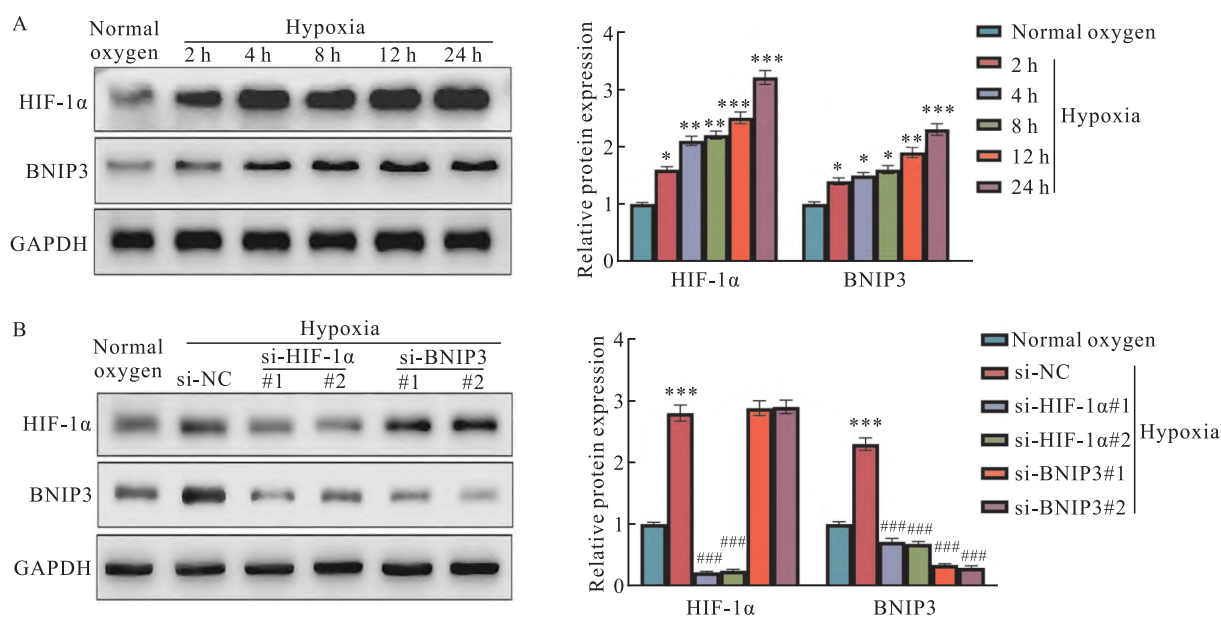


图 1 缺氧触发 HUVECs 中 HIF-1 α 和 BNIP3 的表达

Fig. 1 Expression of HIF-1 α and BNIP3 in HUVECs triggered by hypoxia

A: Western blot analysis of the expression of HIF-1 α and BNIP3 proteins in HUVECs; B: Western blot analysis of the expression of HIF-1 α and BNIP3 in HUVECs; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal oxygen group; ### $P < 0.001$ vs si-NC group.

摄取和乳酸释放的速率增加 ($P < 0.05$); 与缺氧 + si-NC 组比较, 缺氧 + si-HIF-1 α 组 HUVECs 中葡萄糖摄取和乳酸产生降低 ($F = 28.15, 26.74$, 均 $P < 0.01$, 图 3B、3C)。ECAR 动力学曲线进一步证明, 与缺氧 + si-NC 组比较, 缺氧 + si-HIF-1 α 组糖酵解的细胞内代谢物 (丙酮酸、乳酸和 3-磷酸甘油酸) 减

少 ($P < 0.05$, 图 3D - 3F)。BNIP3 的过表达逆转了 HIF-1 α 敲低对糖酵解的影响。

2.4 HIF-1 α /BNIP3 轴调节缺氧条件下内皮细胞的生物学功能 与常氧组比较, 缺氧 + si-NC 组 HUVECs 在培养第 72 小时的增殖活性降低 ($P < 0.05$), 并且伤口愈合面积和管形成数量增加 ($P < 0.01$)。

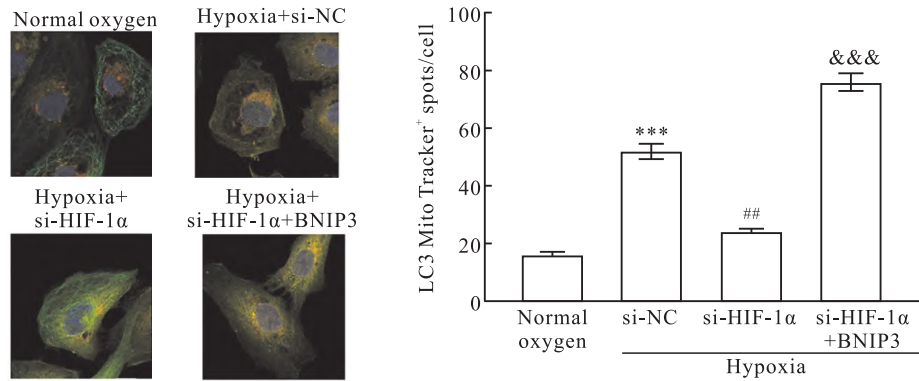


图2 免疫荧光分析 HUVECs 的自噬流量

Fig.2 Autophagy flux of HUVECs analyzed by immunofluorescence

Green fluorescence was LC3 immunofluorescence staining, and red fluorescence was MitoTracker immunofluorescence staining $\times 200$; *** $P < 0.001$ vs Normal oxygen group; ## $P < 0.01$ vs Hypoxia + si-NC group; &&& $P < 0.001$ vs Hypoxia + si-HIF-1 α group.

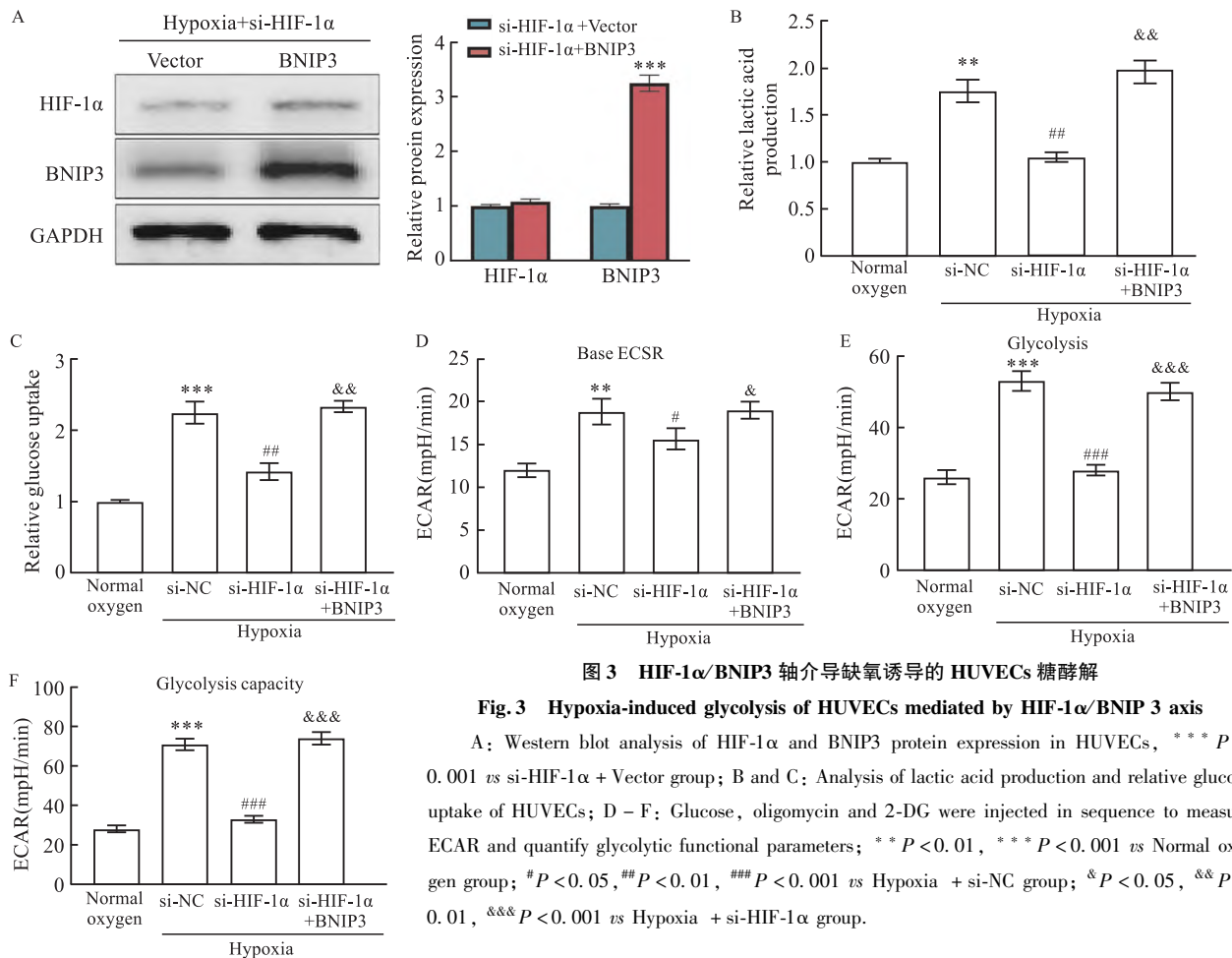


图3 HIF-1 α /BNIP3 轴介导缺氧诱导的 HUVECs 糖酵解

Fig.3 Hypoxia-induced glycolysis of HUVECs mediated by HIF-1 α /BNIP3 axis

A: Western blot analysis of HIF-1 α and BNIP3 protein expression in HUVECs, *** $P < 0.001$ vs si-HIF-1 α + Vector group; B and C: Analysis of lactic acid production and relative glucose uptake of HUVECs; D - F: Glucose, oligomycin and 2-DG were injected in sequence to measure ECAR and quantify glycolytic functional parameters; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal oxygen group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Hypoxia + si-NC group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs Hypoxia + si-HIF-1 α group.

与缺氧 + si-NC 组比较,缺氧 + si-HIF-1 α 组 HUVECs 在培养第 24、48、72 小时的增殖活性降低 ($P < 0.05$),伤口愈合面积、管形成数量降低 ($P < 0.001$)。BNIP3 的过表达逆转了 HIF-1 α 敲低对生物学功能的影响,见图 4。

2.5 抑制 HIF-1 α 或 BNIP3 对 OIR 模型小鼠眼部新生血管形成的影响 通过体内实验评估 HIF-1 α 和 BNIP3 对眼部新生血管形成的影响。Western blot 分析显示,与 OIR 组比较,OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组小鼠的视网膜组织中 BNIP3、VEGFA 的蛋白质水平降低 ($F = 33.84, 21.42$, 均 $P < 0.01$,图 5A、B)。与 OIR 组比较,OIR + si-HIF-1 α 组和 OIR + si-BNIP3 组小鼠的视网膜组织中新生血管形成和血管闭塞区域减少 ($F = 51.60, 48.12$, 均 $P < 0.05$,图 5C、D)。

3 讨论

眼部病理性血管生成是一个复杂的多步骤过程,在血流量减少的情况下最容易发生在缺血和缺

氧的区域附近^[12]。HUVECs 表现出与脉络膜或视网膜内皮细胞相似的内皮表型和功能,被广泛用作眼部血管生成体外研究的主要细胞模型^[13]。本研究发现缺氧促进 HUVECs 中 HIF-1 α 、BNIP3 的表达,HIF-1 α 的敲低抑制缺氧增强的 HUVECs 糖酵解(如,葡萄糖摄取和乳酸产生)和激活(如,增殖、迁移、管形成),所有这些都被 BNIP3 过表达逆转。此外,玻璃体腔内注射 HIF-1 α 或 BNIP3 siRNA 显著抑制了 OIR 小鼠模型中的新生血管生长。这些发现为 HIF-1 α 对内皮糖酵解的作用提供了新的见解,并突出了在治疗眼部病理性血管生成中靶向 HIF-1 α /BNIP3 轴的潜力。

先前的研究^[14]表明,HIF-1 α 是视网膜血管发育所必需的。HIF-1 α 分别通过激活 Myc 信号和小 GTP 酶 CDC42 来控制调节血管生成萌芽和分支的内皮细胞的增殖和迁移^[15]。最近的一项研究^[16]表明,HIF-1 α 与信号转导子和转录因子 3 激活子相互作用,促进转录因子 3 激活子转位和 VEGF 转录,从而促进缺氧诱导的内皮细胞增殖、迁移和管形成。

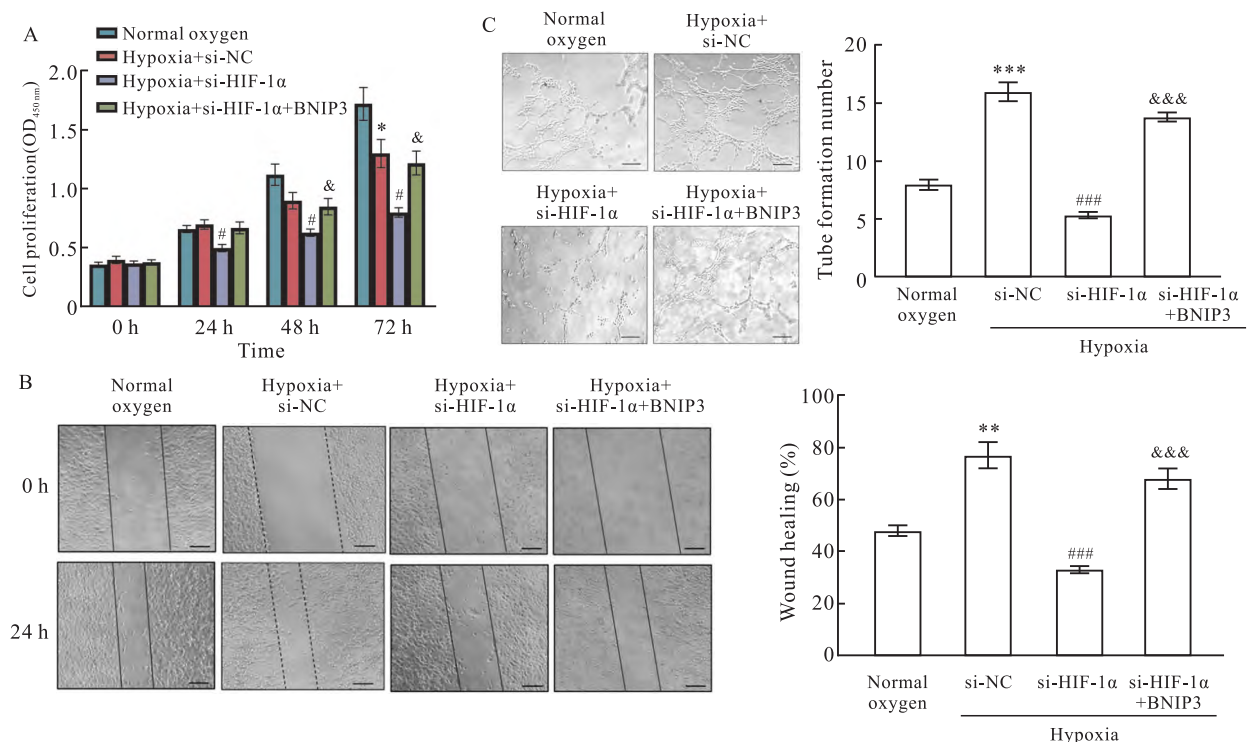
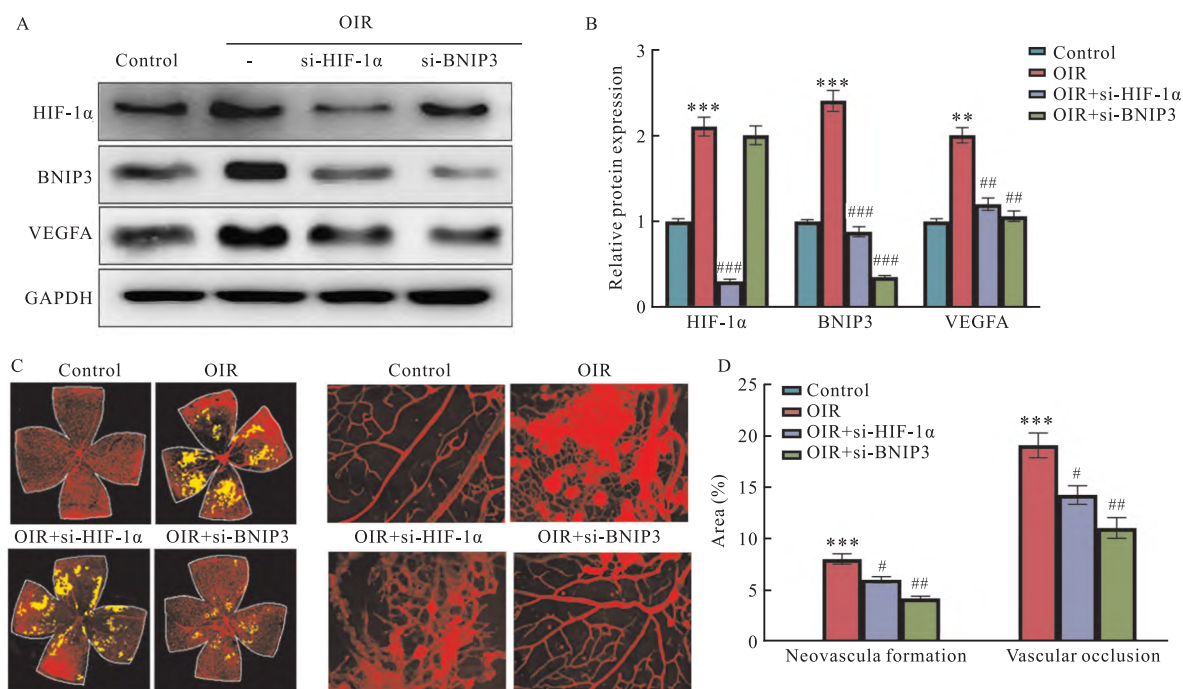


图 4 HIF-1 α /BNIP3 轴介导缺氧条件下 HUVECs 的生物学功能

Fig. 4 Biological function of HUVECs under hypoxia mediated by HIF-1 α /BNIP3 axis

A: The proliferation of HUVECs was detected by CCK-8 method; B: The migration of HUVECs was evaluated by scratch test, and the percentage of healing area was quantified and analyzed, Scale bar = 500 μ m ($\times 50$); C: Matrix glue analysis was used to evaluate the tube formation of HUVECs, Scale bar = 500 μ m ($\times 50$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal oxygen group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs Hypoxia + si-NC group; & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ vs Hypoxia + si-HIF-1 α group.

图5 抑制 HIF-1 α 或 BNIP3 对 OIR 模型小鼠眼部新生血管形成影响 ($n=12$)Fig. 5 Effect of inhibiting HIF-1 α or BNIP3 on ocular neovascularization in OIR model mice ($n=12$)

A: Western blot analysis of the protein expression levels of HIF-1 α , BNIP3 and VEGFA in the retina of mice in each group; B: Quantitative analysis of HIF-1 α , BNIP3 and VEGFA; C: Representative confocal image of flat retina stained with lectin (red) $\times 200$; D: Quantification of the areas of neovascularization and vascular occlusion; n value represents the number of eyes; * $P < 0.01$, * * $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs OIR group.

另一项研究^[17]提出,抑制 HIF-1 α 减轻了小鼠 OIR 模型中的视网膜病理性血管生成。与先前研究一致,本研究也证实了 HIF-1 α 在缺氧介导的病理性血管生成中的促血管生成作用。本研究还发现在低氧条件下,敲除 HIF-1 α 导致内皮细胞糖酵解显著减少,表现为葡萄糖摄取和乳酸产生减少,表明 HIF-1 α 对于内皮细胞中低氧触发的糖酵解是必需的。

内皮细胞大多是静止的,但可以感知和响应周围缺氧组织释放的信号,导致向高度糖酵解代谢的转变^[5]。此外,生长因子如 VEGF 和 FGF2 增强糖酵解酶的表达,并增加糖酵解以支持血管发芽的高 ATP 需求,表明糖酵解对于生长因子驱动的血管生成也是至关重要^[3]。最近的一项研究^[18]表明,HIF-1 α 通过上调转化细胞系中 GLUT3 的表达来促进细胞增殖和糖酵解。BNIP3 是 ECs 中主要的能量代谢调节因子,在 OIR 和 AMD 小鼠模型中,药物阻断或敲除 BNIP3 可抑制视网膜新生血管形成^[10]。

线粒体自噬在促进细胞分化所需的向糖酵解的代谢转变中发挥重要作用,它为能量需求提供必要的成分,并控制线粒体的质量和调节代谢酶的活性^[8]。研究^[9]发现,BNIP3 上调增强糖酵解,其敲低

会导致糖酵解代谢的转变。这些证据表明,BNIP3 可能在糖酵解和氧化磷酸化途径之间的平衡中充当关键的代谢传感器。本研究发现在 HIF-1 α 敲低的 HUVECs 中 BNIP3 的表达减少,BNIP3 的表达上调部分逆转了 HIF-1 α 敲低对线粒体自噬、糖酵解以及 HUVECs 增殖、迁移和管形成的抑制作用,提示 HIF-1 α 敲低可能通过减少 BNIP3 介导的糖酵解诱导 HUVECs 代谢功能障碍。因此,笔者预测 HIF-1 α /BNIP3 信号通路可能作为调节 HUVECs 的糖酵解途径的重要调节因子。

综上所述,本研究发现 HIF-1 α /BNIP3 信号通路在缺氧条件下促进了 HUVECs 中线粒体自噬激活,并且 HIF-1 α /BNIP3 敲低可能通过抑制线粒体自噬激活和糖酵解,损害内皮细胞行为并改善病理性血管生成。因此,抑制 HIF-1 α /BNIP3 信号通路可能有助于病理性血管生成相关眼科疾病的新治疗策略的发展。

参考文献

- [1] Dai C, Webster K A, Bhatt A, et al. Concurrent physiological and pathological angiogenesis in retinopathy of prematurity and e-

- merging therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4809. doi: 10.3390/ijms22094809.
- [2] Campochiaro P A, Akhlaq A. Sustained suppression of VEGF for treatment of retinal/choroidal vascular diseases[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100921. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100921.
- [3] Rao H, Jalali J A, Johnston T P, et al. Emerging roles of dyslipidemia and hyperglycemia in diabetic retinopathy: molecular mechanisms and clinical perspectives[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 620045. doi:10.3389/fendo.2021.620045.
- [4] Liu X, Cui H. The palliative effects of folic acid on retinal microvessels in diabetic retinopathy *via* regulating the metabolism of DNA methylation and hydroxymethylation[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10766 – 74. doi: 10.1080/21655979.2021.2003924.
- [5] Leung S W S, Shi Y. The glycolytic process in endothelial cells and its implications[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(2): 251 – 9. doi:10.1038/s41401-021-00647-y.
- [6] Marzoog B A. Autophagy behavior in endothelial cell regeneration[J]. *Curr Aging Sci*, 2024, 17(1): 58 – 67. doi:10.2174/0118746098260689231002044435.
- [7] Krantz S, Kim Y M, Srivastava S, et al. Mitophagy mediates metabolic reprogramming of induced pluripotent stem cells undergoing endothelial differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(6): 101410. doi:10.1016/j.jbc.2021.101410.
- [8] Gao A, Jiang J, Xie F, et al. BNIP3 in mitophagy: novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 506: 72 – 83. doi: 10.1016/j.cca.2020.02.024.
- [9] Martens M D, Field J T, Seshadri N, et al. Misoprostol attenuates neonatal cardiomyocyte proliferation through BNIP3, perinuclear calcium signaling, and inhibition of glycolysis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 146: 19 – 31. doi:10.1016/j.yjmcc.2020.06.010.
- [10] Kunimi H, Lee D, Ibuki M, et al. Inhibition of the HIF-1 α /BNIP3 pathway has a retinal neuroprotective effect[J]. *FASEB J*, 2021, 35(8): e21829. doi:10.1096/fj.202100572R.
- [11] Ma X, Wu W, Liang W, et al. Modulation of cGAS-STING signaling by PPAR α in a mouse model of ischemia-induced retinopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(48): e2208934119. doi:10.1073/pnas.2208934119.
- [12] Shiwani H A, Elfaki M Y, Memon D, et al. Updates on sphingolipids: spotlight on retinopathy[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2021, 143: 112197. doi:10.1016/j.biopha.2021.112197.
- [13] Brinks J, Van Dijk E H C, Klaassen I, et al. Exploring the choroidal vascular labyrinth and its molecular and structural roles in health and disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2022, 87: 100994. doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100994.
- [14] Konecny L, Quadir R, Ninan A, et al. Neurovascular responses to neuronal activity during sensory development[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 1025429. doi:10.3389/fncel.2022.1025429.
- [15] Zhao C, Liu Y, Meng J, et al. LGALS3BP in microglia promotes retinal angiogenesis through PI3K/AKT pathway during hypoxia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 63(8): 25. doi:10.1167/iov.63.8.25.
- [16] Zhang Y X, Jing M R, Cai C B, et al. Role of hydrogen sulphide in physiological and pathological angiogenesis[J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(3): e13374. doi:10.1111/cpr.13374.
- [17] Han N, Xu H, Yu N, et al. MiR-203a-3p inhibits retinal angiogenesis and alleviates proliferative diabetic retinopathy in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model *via* targeting VEGFA and HIF-1 α [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(1): 85 – 94. doi:10.1111/1440-1681.13163.
- [18] Pang Y, Lin Y, Wang X, et al. Inhibition of abnormally activated HIF-1 α -GLUT1/3-glycolysis pathway enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma to 5-caffeoylquinic acid and its derivatives[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920: 174844. doi:10.1016/j.ejphar.2022.174844.

Relationship between glycolysis mediated by HIF-1 α /BNIP3 pathway and oxygen-induced retinal angiogenesis in neonatal mice

Yi Yan, Chen Feifei, Tan Yun, Du Heng

[Dept of Pediatrics, Wuhan First Hospital (Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine), Wuhan 430030]

Abstract Objective Based on glycolysis of hypoxia inducible factor -1 α (HIF-1 α)/Bcl2/adenovirus E1B interacting protein 3 (BNIP3) pathway, to study the mechanism of oxygen-induced retinal angiogenesis in neonatal mice. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into normoxic group, hypoxia + si-NC group, hypoxia + si-HIF-1 α group and hypoxia + si-HIF-1 α + BNIP group. In normoxic group, HUVECs were exposed to normoxic (21% O₂) and cultured. Hypoxia + si-NC group, hypoxia + si-HIF-1 α group and hypoxia + si-HIF-1 α + BNIP3 group were treated with si-NC, si-HIF-1 α or si-HIF-1 α combined with BNIP3 plasmid for 36 h, and then exposed to hypoxia (1% O₂) for culture. The autophagy, glycolysis, proliferation, migration and tube formation of mitochondria were investigated by immunofluorescence, metabolic measurement, cell viability

ty, scratch experiment and tube formation experiment. On the 7th day after birth, C57BL/6J mice were randomly assigned to different treatment groups: control group, oxygen-induced retinopathy (OIR) group, OIR + si-HIF-1 α group and OIR + si-BNIP group. The neovascularization and vascular occlusion were measured. **Results** Compared with normoxic group, the rate of LC3 + MitoTracker + spots, glucose uptake and lactic acid release in HUVECs in hypoxia + si-NC group increased significantly ($P < 0.001$). Compared with hypoxia + si-NC group, the rate of LC3 + MitoTracker + spots, glucose uptake and lactic acid release in HUVECs in hypoxia + si-HIF-1 α group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with normoxic group, the proliferation activity of HUVECs in hypoxia + si-NC group decreased significantly ($P < 0.05$), and the wound healing area and the number of tubes formed increased significantly ($P < 0.01$). Compared with hypoxia + si-NC group, the proliferation activity of HUVECs in hypoxia + si-HIF-1 α group decreased significantly at the 24th, 48th and 72th hours of culture ($P < 0.05$), and the wound healing area and the number of tubes formed decreased significantly ($P < 0.001$). Overexpression of BNIP3 reversed the effects of HIF-1 α knock-down on mitochondrial autophagy, glycolysis and biological function. Compared with OIR group, the neovascularization and vascular occlusion areas in retina of mice in OIR + si-HIF-1 α group and OIR + si-BNIP3 group reduced significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway promotes mitochondrial autophagy activation in HUVECs under hypoxia, which plays an important role in controlling endothelial function and angiogenesis.

Key words hypoxia inducible factor-1 α ; newborn mice; retinal blood vessels; glycolysis; mitochondrial autophagy; human umbilical vein endothelial cells

Fund program Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2019CFB401)

Corresponding author Yi Yan, E-mail: oylg07@163.com

(上接第 225 页)

and other groups. The distribution and internalization of VE-cadherin in each group were measured using immunofluorescence. **Results** Miles experiment results indicated that dye exudation in lung tissue of WT-model group was significantly higher than that of WT-con group ($P < 0.01$). The dye exudation in the lung tissue of KO-model group increased compared with WT-model group ($P < 0.05$). The results of endothelial cell layer permeability test showed that the permeability of FITC-dextran in si-CD151 group was significantly higher than that in control group after VEGF-A stimulation for 30, 60 and 120 min ($P < 0.05$). Transcriptome sequencing results suggested that CD151 in endothelial cells was closely related to vesicle-mediated transport. Compared with other groups, protein and mRNA levels of VE-cadherin in CD151 knockdown endothelial cells was significantly lower (all $P < 0.01$). The immunofluorescence assay demonstrated that after VEGF-A stimulation, the decrease of CD151 expression significantly impaired the expression of VE-cadherin at cell-cell contacts and reduced the CD151-VE-cadherin colocalization in the perinuclear region compared with other groups. **Conclusion** The absence of CD151 affects the internalization and recycling of endothelial cell vesicles, affects the expression and internalization of VE-cadherin, and then influences vascular permeability.

Key words acute lung injury; CD151; internalized recycling; endothelial cells; vascular permeability; VE-cadherin

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81873535); Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2020CFB573)

Corresponding author Liu Jingbo, E-mail: m13079945917@163.com