◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Jul; 31(7): 875-884

硫化氢对低氧性肺动脉高压大鼠 FDX1-铜死亡途径的干预

王淑远[1]，黄　曼[2]，陈思安[2]，韩丛美[3]，程　缘[2]，
袁琳波[3]，叶　环[1]，王万铁[2]

[1]温州市人民医院呼吸与危重症医学科，温州 325400，浙江；
[2]温州医科大学基础医学院病理学与病理生理学系，温州 325035，浙江；
[3]温州医科大学基础医学院机能学系，温州 325035，浙江

摘要　**目的**：探究硫化氢（hydrogen sulfide，H_2S）是否通过铁氧化还原蛋白 1（ferredoxin 1，FDX1）-铜死亡途径来改善大鼠低氧性肺动脉高压（hypoxic pulmonary hypertension，HPH）。**方法**：雄性 Sprague Dawley（SD）大鼠随机分为 Control 组、Hypoxia 组和 Hypoxia+NaHS 组，每组各 10 只。Control 组大鼠置于常氧（21% O_2）环境中，每天腹腔注射等体积生理盐水；Hypoxia 组大鼠和 Hypoxia+NaHS 组大鼠置于低氧箱中，每天腹腔注射 14 μmol/kg 的 NaHS。造模 21 d 结束后，用右心导管法检测各组大鼠的平均肺动脉压（mPAP），称重并计算右心室肥厚指数（RVHI）；ELISA 法检测内皮素-1（ET-1）、一氧化氮（NO）和前列环素（PGI_2）的含量；电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法检测铜离子浓度；Western blot 法检测铜转运蛋白 1（CTR1）、铜转运 ATP 酶 α（ATP7A）、铜转运 ATP 酶 β（ATP7B）、FDX1、硫辛酸合成酶（LIAS）、二氢硫辛酸转乙酰基酶（DLAT）、二氢硫辛酸转乙酰基酶二聚体（DLAT Dimer）、二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶（DLST）；RT-qPCR 法检测 FDX1、LIAS、DLAT、二氢硫辛酰胺脱氢酶（DLD）mRNA 表达水平；JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位变化；化学发光法检测 ATP 含量；ELISA 法检测丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 α1（PDHA1）含量；磺基水杨酸法检测柠檬酸（CA）含量。**结果**：与 Control 组比较，Hypoxia 组中 mPAP 和 RVHI 显著上升；ET-1 的浓度显著升高而 NO 和 PGI_2 的浓度显著降低；铜离子浓度显著升高；铜转运蛋白 1 表达含量显著升高，铜外排蛋白 ATP7A、ATP7B 表达含量显著降低；铜死亡相关蛋白 FDX1、LIAS、DLAT、DLST 表达含量均显著降低而 DLAT 二聚体蛋白表达含量显著升高；*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD* 基因 mRNA 表达水平显著降低；线粒体功能指标 JC-1 和 ATP 表达水平显著降低；三羧酸循环指标 PDHA1 和 CA 表达含量显著降低（均 $P<0.05$）。与 Hypoxia 组比较，Hypoxia+NaHS 组中的上述指标的变化均可被治疗药物 NaHS 显著逆转。**结论**：H_2S 可能通过调控 FDX1-铜死亡途径影响肺组织细胞线粒体功能、代谢，从而缓解肺血管收缩，改善肺动脉高压。

关键词　铜离子；肺动脉高压；铜死亡；硫化氢

中图分类号：R544.1；R965.2
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)07-0875-10
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.07.002

肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension，PAH）是一种以肺动脉压力升高超过某一界定值为特征的血流动力学异常状态，临床主要表现为呼吸困难、乏力、晕厥、胸痛、咯血等。作为一种进行性严重的血管病变，其特征是肺动脉收缩并发生重塑，该病可导致右心功能衰竭，甚至死亡[1]。低氧性肺动脉高压（hypoxic pulmonary hyperten-

2025-12-04 收稿　2026-03-27 修回
浙江省介入肺脏病重点实验室建设项目（2019E10014）
王淑远，女，主治医师，研究方向：肺动脉高压及缺血再灌注损伤。
E-mail: 944372370@qq.com
黄曼，共同第一作者，女，硕士研究生，研究方向：肺动脉高压。
E-mail: 1440480267@qq.com
王万铁，通信作者，男，教授，研究方向：肺动脉高压及缺血再灌注损伤。
E-mail: wwt@wmu.edu.cn
叶环，共同通信作者，男，主任医师，研究方向：肺动脉高压。
E-mail: wsyyehuan@126.com

sion, HPH)是 PAH 中的一个极其重要的类型，又称为肺疾病和/或低氧相关性 PAH[2-3]。虽然近年来 PAH 的治疗取得了较大的进展，但患者的预后仍不乐观，临床上仍需更多针对 PAH 发病机制的有效治疗药物。

铜离子是机体必不可少的微量元素之一，具有高度氧化还原活性的特征，在肺动脉高压患者和动物中，组织和血清的铜浓度均显著升高，低铜饮食可以预防实验性肺动脉高压[4]。在正常条件下，细胞中铜的浓度受到严格控制，Tsvetkov 等[5]于近期发现了一种新的细胞死亡方式即铜死亡。铜死亡是通过一种不同于所有其他已知的调节细胞死亡的机制发生的，包括细胞凋亡、焦亡、铁死亡和坏死性凋亡，是一种与线粒体呼吸相关的铜依赖性细胞死亡模式。因此，我们猜想，肺动脉高压模型中可能存在与铜离子稳态失衡密切相关的铜死亡的调控。

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种无色、可燃的水溶性气体，哺乳动物细胞通过酶途径产生内源性硫化氢[6]，内源性 H_2S 合成和 H_2S 依赖血管舒张的减少能导致高血压患者的微血管功能障碍[7]，在心血管疾病中发挥保护作用[8]。H_2S 已被报道在低水平下能增强线粒体电子传递和细胞生物能量[9]，在植物种子中 H_2S 可能通过抑制铜的吸收来减轻铜的毒性效应[10-11]，但在哺乳动物中并未得到广泛证实，所以进一步了解 H_2S 在心血管系统中对铜离子的作用具有重要的临床意义。本课题组先前研究结果已经证实 H_2S 在常氧条件下对大鼠肺组织并无作用[12]，故本研究通过建立低氧肺动脉高压模型，研究铜死亡在肺动脉高压中的可能作用以及调控机制，从而为 H_2S 治疗 PAH 的病理生理机制提供新线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光液购自上海雅酶生物医药科技有限公司；β-actin、铁氧化还原蛋白 1(ferredoxin 1, FDX1)、硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase, LIAS)、二氢硫辛酸转乙酰基酶(dihydrolipoyl transacetylase, DLAT)、二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶(dihydrolipoamide S-succinyltransferase, DLST)、CTR1、铜转运 ATP 酶 α(ATPase copper transporting alpha, ATP7A)、铜转运 ATP 酶 β(ATPase copper transporting beta, ATP7B)一抗(批号：XA2652BP9248)均购自武汉博士德生物工程有限公司；蛋白电泳仪和转膜仪购自上海天能科技有限公司(型号：A-14 744-R3726)；化学发光成像系统购自美国通用电气公司；*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD* 引物合成由浙江鹭鸣生物科技有限公司完成；高通量荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司；NaHS 购自上海阿拉丁生物科技有限公司(批号：207 683-19-0)。根据文献及预实验[13]，以超纯水为溶剂，NaHS 固体配制成硫氢化钠溶液配制成 14 μmol/kg 的工作浓度，现用现配。

1.2 实验动物 雄性 SPF 级 Sprague Dawley(SD)大鼠 30 只，体质量(180±20)g，购自北京维通利华实验动物科技有限公司，动物使用许可证：SYXK(浙)2021-0020。本研究动物方案获温州医科大学动物伦理委员会批准。将雄性 SD 大鼠随机分为 Control 组、Hypoxia 组和 Hypoxia+NaHS 组，每组 10 只。Control 组大鼠置于 SPF 级常氧(21% O_2)环境中，每日腹腔注射与 NaHS 水溶液等体积的生理盐水；Hypoxia 组大鼠置于低氧箱中(9% ~ 10% O_2)，每日腹腔注射等体积生理盐水；Hypoxia+NaHS 组大鼠同样置于低氧箱中，每日腹腔注射 14 μmol/kg NaHS 水溶液。三组大鼠常规饲料喂养，造模时间为 21 d[14]，到期后进行后续检测。

1.3 大鼠肺动脉平均压和右心室肥大指数检测 大鼠称重，戊巴比妥钠麻醉，固定，小动物剃毛机剔除右边颈部皮肤毛发，从外上向内剪开皮肤一小口，钝性分离组织和肌肉，剔除表面脂肪组织后游离颈外静脉，远心端系死结，近心端打松结备用。剪一段 PE 导管，以直尺为标准，每隔 1 cm 做一标记，在 8 cm 处缠上胶布并标记导管头朝向。将导管连接好压力换能器后用剪刀在颈外静脉上剪一个“V”字形开口，手持导管插入，稍稍系紧近心端棉线。保持导管头朝内，标记朝外前进至 2 cm 左右接近右心耳，此时轻轻顺时针旋转 90 ~ 180°，继续缓慢前进，在 4 ~ 4.5 cm 到达房室口，可看见导管有心跳频率类似的振动，可见到振幅较大的心室波。此时将导管逆时针旋转，继续往里前进 1 ~ 2 cm 即进入肺动脉，可见受呼吸影响的肺动脉波，利用 BL-420F 生物信息采集系统记录肺动脉压力波形并计算平均肺动脉压(mean

pulmonary artery pressure, mPAP)。测量结束后剪开胸腔,在肺尖处用生理盐水灌注肺组织,最后分离相应组织并计算右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)。

1.4　ELISA 法检测大鼠肺组织中内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列环素(prostacyclin I_2, PGI_2)的含量　称取 50 mg 肺组织,按 1:9 的重量体积比加入 PBS 进行组织匀浆。采用竞争 ELISA 法,往预先包被的相应的微孔板中依次加入样本/校准品和 Asaay Diluent,经过温育洗涤,再加入 SA-HRP 温育。最后再次洗涤后加入底物 TMB 显色,室温显色并用终止液终止反应后读取 OD 值。OD 值高低和样品中检测的物质呈负相关。

1.5　电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)检测肺组织中铜元素含量　取适量肺组织样品,置于洁净干燥的聚四氟乙烯微波管之中,加入优级纯浓硝酸进行预消解,然后继续加入优级纯浓硝酸放入微波消解仪,进行微波消解。消解结束之后,将消解罐置于 180 ℃ 赶酸加热 30 min,进行赶酸。最后将消解好的样品进行稀释后放入电感耦合等离子体质谱仪检测铜离子检测。

1.6　蛋白免疫印迹(Western blot)检测肺组织中铜转运蛋白和铜死亡相关蛋白　取肺组织 50 mg,按比例加入裂解液后充分研磨,4 ℃ 离心机 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液。用 BCA 试剂盒定量检测蛋白浓度并计算,加入适量 6×loading Buffer 煮沸后以每孔 50 μg 上样量进行蛋白电泳,转膜结束后快封液封闭 10 min。加一抗(LIAS、DLAT、DLST 和 CTR1,稀释比例为 1:1 500),一抗(FDX1、ATP7A 和 ATP7B 稀释比例为 1:1 000),以摇床过夜孵育后次日洗膜、孵育二抗,最后使用化学发光仪曝光并分析。

1.7　实时荧光定量(qPCR)检测肺组织中 FDX1、LIAS、DLAT 和 DLD mRNA 水平　称取 40 mg 肺组织,加入 1 mL 的 RNA 提取试剂研磨后加入 200 μL 氯仿,颠倒混匀后离心 12 min 取上清。加入等体积预冷的异丙醇混匀,之后再离心收集沉淀,沉淀用预冷的 75% 乙醇洗两次后加入适当 DEPC 水溶解,测定 RNA 浓度,根据说明书进行后续逆转录和 qPCR 扩增,引物序列见 Tab.1。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并进行统计分析。

Tab.1　Sequences of the primers for RT-qPCR

Name	Primer sequence (5'-3')
β-actin	Forward: GAGAGGGAAATCGTGCGTA
	Reverse: GGAGGAAGAGGATGCGG
FDX1	Forward: CAGTCCACTTCAAGAACCGAGATG
	Reverse: GATGACAGGTAGAGCAAGCCAAAG
LIAS	Forward: ACAGTGTCATGCTTGAAGGAAAGG
	Reverse: ATTCTGGAACCGTCTCTACATTGTG
DLAT	Forward: GGTGTTCGTTAGCCCTCTTGC
	Reverse: TGTCCTTCTTGATGATTCTGCCTTC
DLD	Forward: CCAGGTGCTGGAGAAATGGT
	Reverse: TGGTTTGCCAAAAGACGCAG

1.8　线粒体提取与线粒体膜电位检测　取 50 mg 新鲜动物组织样本,用 PBS 洗涤干净,用剪刀尽可能剪碎,用冷 PBS 洗涤两次,1 000 *g* 离心 5 min,加入 500 μL 冷的试剂 A,置冰上 10 min 后研磨匀浆。在 4 ℃ 500 r/min 离心 5 min,弃沉淀,收集上清。在 4 ℃ 1 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,收集上清。在 4 ℃ 2 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,收集上清。在 4 ℃ 11 000 r/min 离心 20 min,弃上清,留沉淀。在沉淀中加入 500 μL 冷的试剂 B,混匀。在 4 ℃ 11 000 r/min 离心 20 min,弃上清,留沉淀,沉淀用线粒体保存液重悬。取适量的 JC-1(200×),按每 50 μL JC-1(200×)加入 8 mL ddH_2O 稀释并充分溶解 JC-1,再加入 2 mL Dilution buffer(5×)配成 JC-1 工作液。将纯化好的线粒体按需加入工作液孵育 12 min。JC-1 单体在检测时设置发射波长为 530 nm,激发波长为 490 nm;JC-1 聚合物在检测时设置发射波长为 590 nm,激发波长为 525 nm。线粒体膜电位的变化以荧光强度比值来表示。

1.9　化学发光法检测大鼠肺组织中的 ATP 含量　把 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释成 0.1、1、10 μmoL/L 3 个浓度。每 20 mg 组织加入约 200 μL 裂解液,然后匀浆裂解。按照说明书比例配置 ATP 检测工作液,每孔加入 100 μL,室温放置 3 ~ 5 min 后在检测孔加上 20 μL 样品或标准品,用化学发光仪测定数据值。

1.10　ELISA 法检测大鼠肺组织的丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 α1（pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, PDHA1）含量　设置校准品孔、样本稀释孔、空白孔和样本孔，按照校准品每孔 50 μL，样本稀释液每孔 50 μL，样本孔每孔 50 μL 加样，加入相应生物素抗体后盖住反应板。采用双抗体夹心法的步骤包括温育、洗涤、加酶、温育、洗涤、显色、终止、测定吸光度值进行。计算标准曲线得出各组样品中 PDHA1 含量。

1.11　磺基水杨酸法检测大鼠肺组织的柠檬酸（citric acid, CA）含量　铁（Ⅲ）-磺基水杨酸生成紫红色络合物，柠檬酸可使该络合物颜色褪至橙红色，在一定波长下，其吸光度的减小与柠檬酸含量在一定条件下呈正比。按照每 0.05 g 组织加入 500 μL 提取液的比例进行冰浴匀浆（12 000 r/min，4 ℃ 离心 10 min），然后取上清液冰上待测。在 96 孔板中依次加入试剂一、试剂二、提取液、待测样本和蒸馏水，混匀，室温条件下孵育 20 min，于 470 nm 处读取吸光度值并计算。

1.12　统计学处理　采用 SPSS 23.0 软件对各组实验数据进行统计学分析，所有实验数据均进行正态性检验，实验数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。当实验数据符合正态分布和方差齐性时，多个样本间均数比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），以 α=0.05 作为检验水准，P<0.05 为差异有统计学意义，最后用 Graghpad Prism 10.0 软件绘制统计图。

2　结果

2.1　H_2S 对大鼠 mPAP 和 RVHI 的影响　与 Control 组相比，Hypoxia 组 mPAP 和 RVHI 明显升高（P<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组 mPAP 和 RVHI 明显降低，差异有统计学意义（P<0.01）（Fig.1A-C）。以上结果说明 HPH 大鼠模型构建成功，给予外源性 H_2S 后能显著改善大鼠的肺动脉高压。

2.2　H_2S 对大鼠 ET-1、NO 和 PGI_2 的影响　与 Control 组相比，Hypoxia 组 ET-1 的浓度明显升高（P<0.01），NO 和 PGI_2 的浓度明显降低，差异有统计学意义（P<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+

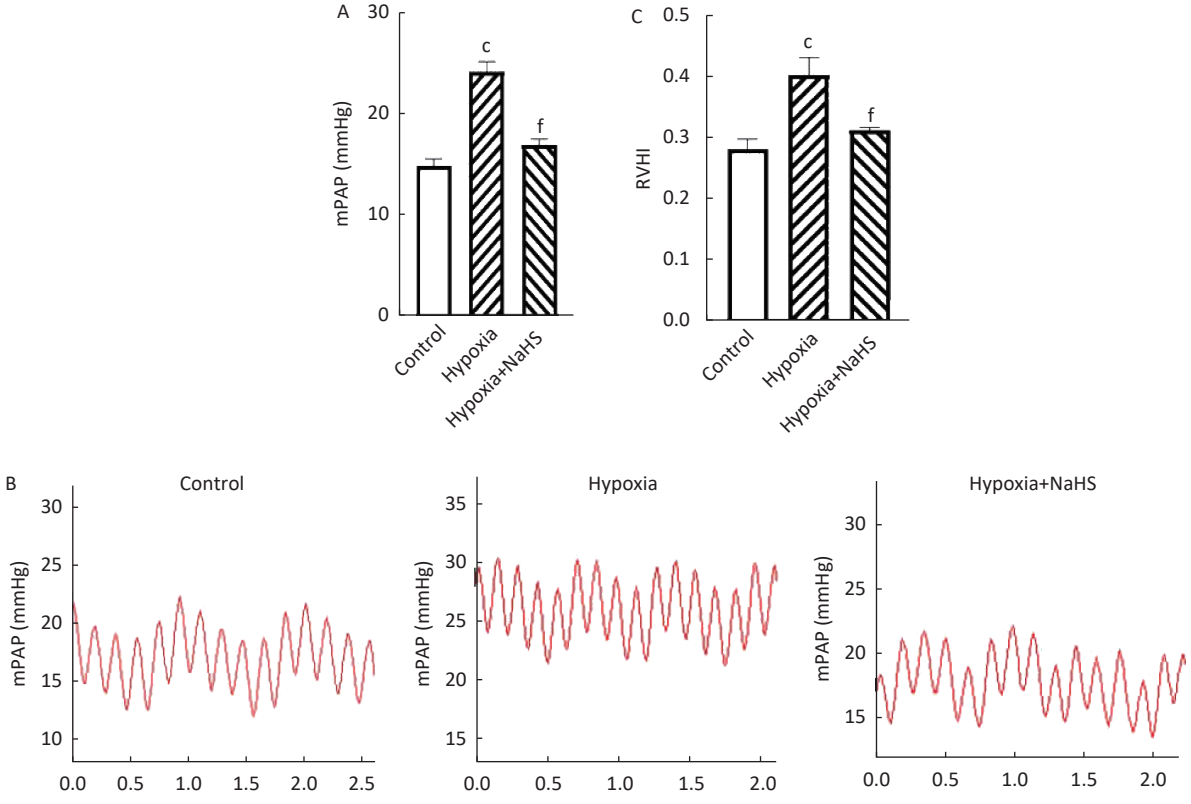


Fig.1　Effect of H_2S on hemodynamic indexes in hypoxia pulmonary hypertension (HPH) rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

A: mean pulmonary artery pressure; B: mean pulmonary artery pressure waveform diagram; C: right ventricular hypertrophy index. ^cP<0.01, compared with control group; ^fP<0.01, compared with Hypoxia group.

NaHS 组 ET-1 的浓度明显降低（*P*<0.01），NO 和 PGI_2 的浓度明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）（Fig.2A-C）。以上结果说明 HPH 大鼠模型中肺血管收缩和舒张功能发生障碍，给予外源性 H_2S 后能显著改善该情况。

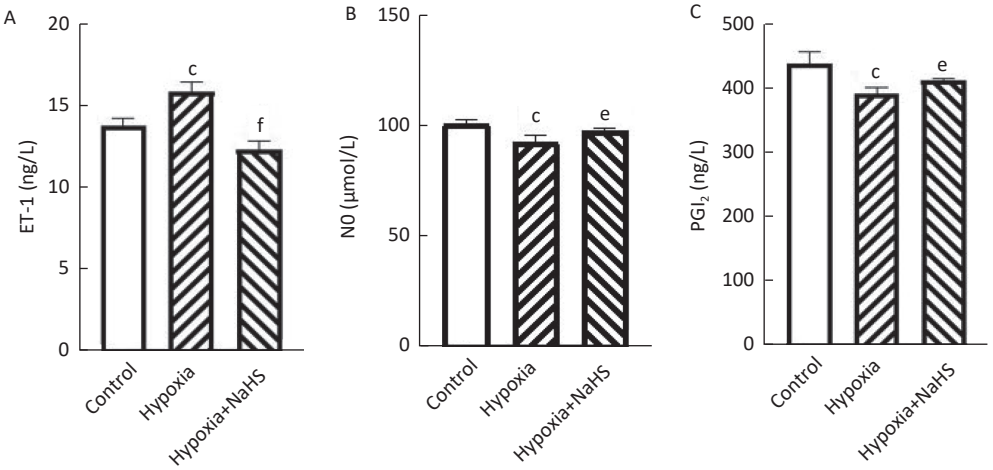


Fig.2　Effect of H_2S on ET-1, NO and PGI_2 levels in the lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: statistical chart of ET-1 concentration; B: statistical chart of NO concentration; C: statistical chart of PGI_2 concentration. ^cP<0.01, compared with control group; ^eP<0.05, ^fP<0.01, compared with Hypoxia group.

2.3　H_2S 对大鼠肺组织中铜离子和铜离子转运蛋白表达的影响　与 Control 组相比，Hypoxia 组的铜离子浓度明显升高（*P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组的铜离子浓度明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）。以上结果表明，铜离子浓度在 HPH 中升高，和大量文献研究结论一致，而 NaHS 处理后可明显降低组织中铜离子浓度。Western blot 结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组的 CTR1 蛋白表达明显升高（*P*<0.01），ATP7A、ATP7B 蛋白表达明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05 或 *P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组的 CTR1 蛋白表达明显降低（*P*<0.05），ATP7A、ATP7B 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05 或 *P*<0.01）（Fig.3A-C）。以上结果表明，铜离子转运蛋白在 HPH 中发生相应变化，给予外源性 H_2S 后可以逆转这一现象，与铜离子浓度变化趋势一致。

2.4　H_2S 对大鼠肺组织中铜死亡蛋白表达的影响　Western blot 结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组的 FDX1、LIAS、DLAT、DLST 蛋白表达均明显降低（*P*<0.01），而 DLAT Dimer 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组的 FDX1、LIAS、DLAT、DLST 蛋白表达均明显升高（*P*<0.05 或 *P*<0.01），而 DLAT Dimer 蛋白表达明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）（Fig.4A-B）。以上结果表明，铜死亡蛋白在 HPH 中发生相应变化，给予外源性 H_2S 后可以逆转这一现象。

2.5　H_2S 对大鼠肺组织中 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD* 基因 mRNA 表达的影响　qRT-PCR 结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD* mRNA 表达水平均明显降低（*P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组各基因 mRNA 表达水平均明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）（Fig.5A-D）。以上结果与 Western blot 结果一致，表明 H_2S 可抑制 HPH 中的铜死亡。

2.6　H_2S 对大鼠肺组织中 JC-1 和 ATP 表达含量的影响　与 Control 组相比，Hypoxia 组的 JC-1 和 ATP 的表达含量明显降低（*P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组的 JC-1 和 ATP 表达含量明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）（Fig.6A-B）。以上结果表明，线粒体功能指标在 HPH 中发生了显著变化，给予外源性 H_2S 后可以逆转这一现象。

2.7　H_2S 对大鼠肺组织中 PDHA1 和 CA 表达含量的影响　与 Control 组相比，Hypoxia 组的 PDHA1 和 CA 浓度明显降低（*P*<0.01）；与 Hypoxia 组相比，Hypoxia+NaHS 组的 PDHA1 和 CA 浓度明显升高，差异有统计学意义（*P*<0.05 或 *P*<0.01）（Fig.7A-B）。以上结果表明，与线粒体代谢有关的三羧酸循环指标在 HPH 中发生了显著变化，给予外源性

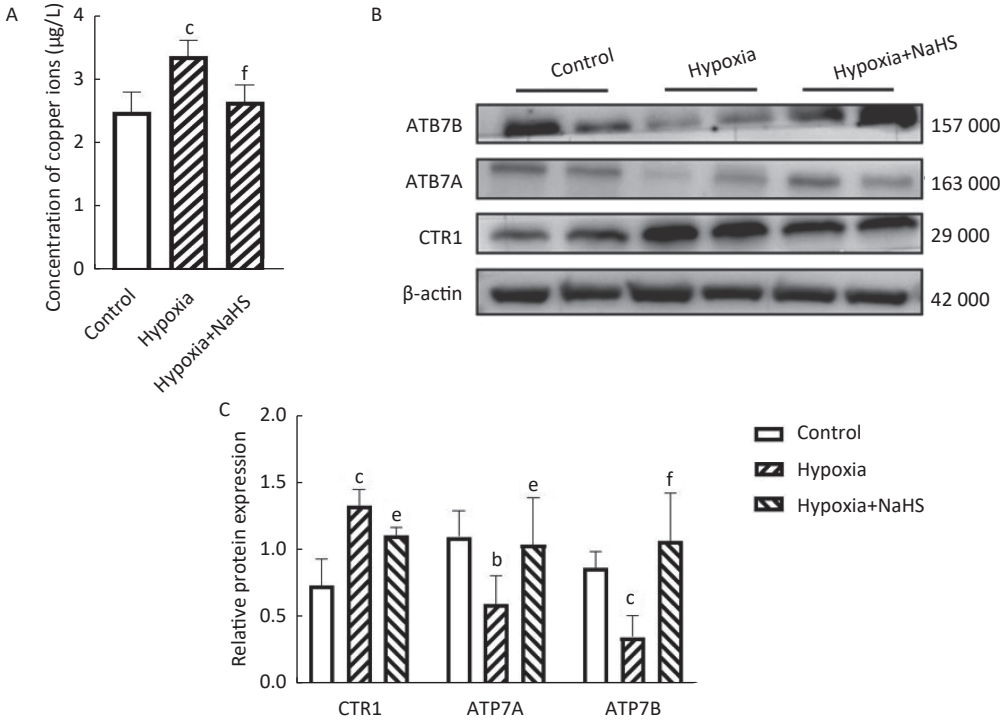


Fig.3 Effect of H_2S on copper ions in lung tissues of rats in different groups and on the expression of copper transport proteins ($\bar{x}\pm s$, n=6)

A: copper ion content in lung tissue of rats; B: protein expression levels of copper transporters proteins in lung tissue of rats; C: copper transporters proteins Western blot statistical chart. ^{b}P<0.05, ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with Hypoxia group.

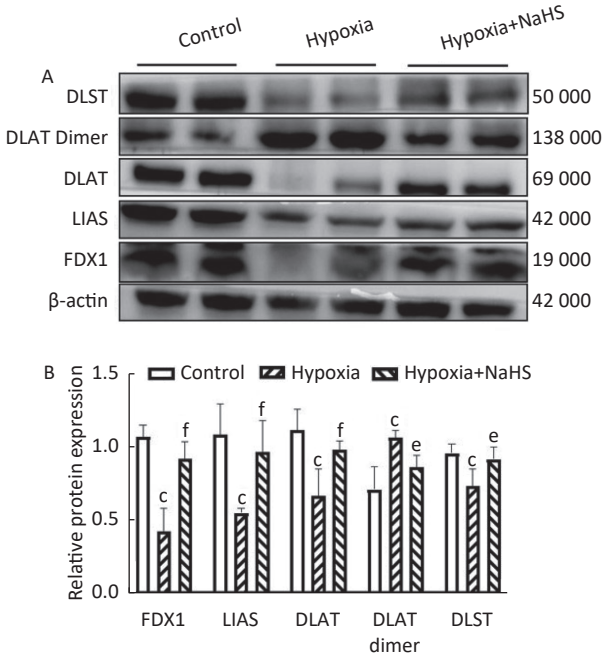


Fig.4 Effect of H_2S on the expression of cuproptosis related proteins in the lung tissues of rats in each group($\bar{x}\pm s$, n=6)

A: protein expression levels of cuproptosis related proteins in lung tissue of rats; B: cuproptosis related proteins Western blot statistical chart. ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with Hypoxia group.

H_2S 后可以逆转这一现象。

3 讨论

HPH 的发病机制复杂，静息状态下，HPH 患者经右心导管测量的肺动脉平均压力通常≥20 mmHg[15]。肺动脉内皮细胞（pulmonary artery endothelial cell, PAECs）是一个连续的单细胞层，排列在肺血管系统中，在血液和间质之间提供了一个半渗透的屏障。在缺氧、遗传、药物或疾病的刺激下，肺血管内膜功能破坏，多种血管活性物质分泌失衡，内皮依赖性血管舒张功能受损，可导致肺动脉阻力的持续增高[16]。ET-1 是内皮细胞生成的一种生物肽，在肺动脉高压中与相应的受体结合而发挥作用。ET-1 与内皮素受体 A（ETA）结合诱导血管收缩，内皮素受体 B（ETB）通过 PLC/IP3 通路可促进 NO 和 PGI_2 的生成[17]。本实验结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组 mPAP 和 RVHI 显著上升，ET-1 的浓度显著升高而 NO 和 PGI_2 的浓度显著降低，表明内皮源性血管收缩因子 ET-1 和血管舒张因子 NO、PGI_2 在 HPH 中发生相应

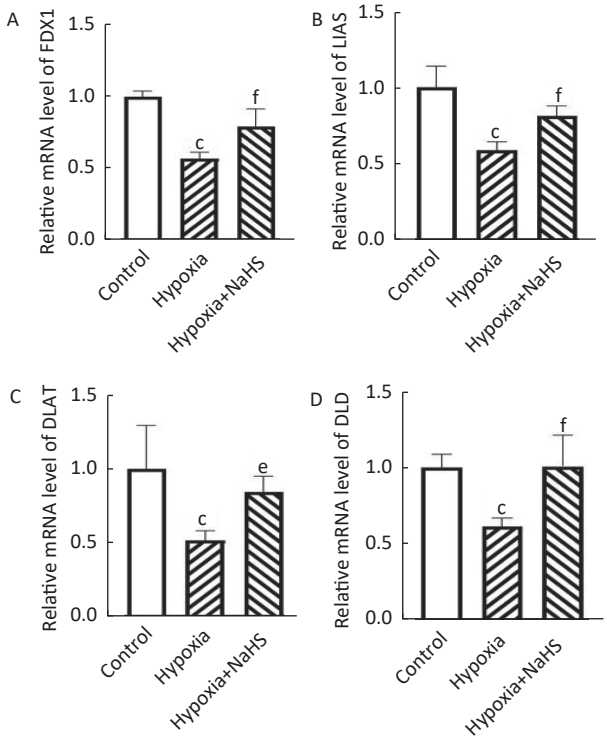


Fig.5　mRNA levels of *FDX1, LIAS, DLAT* and *DLD* in lung tissues of each group ($\bar{x}\pm s$, n=6)

A: relative mRNA level of *FDX1*; B: relative mRNA level of *LIAS*; C: relative mRNA level of *DLAT*; D: relative mRNA level of *DLD*. ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with Hypoxia group.

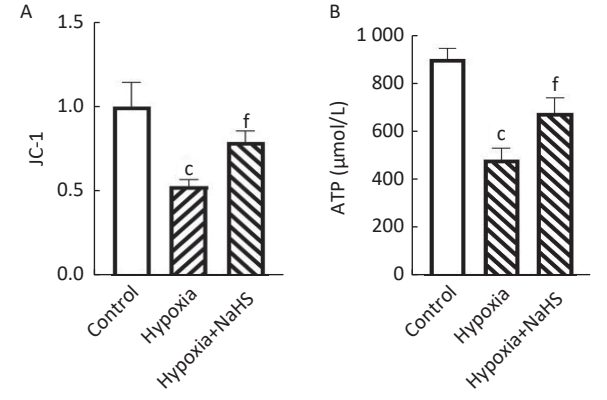


Fig.6　Expression levels of JC-1 and ATP content in lung tissues of eachgroup ($\bar{x}\pm s$, n=5)

A: relative JC-1 level of each group; B: ATP concentration in each group. ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with Hypoxia group.

的变化。大量研究结果表明，细胞死亡在机体的生长、发育和调节稳态等方面起重要作用，本实验室先前研究证实了细胞凋亡、焦亡、自噬等在肺动脉高压疾病发生发展中的重要作用，其作用机制涉及多条信号通路。铜死亡是一种新型细胞死亡形式，可导致线粒体损伤和细胞死亡，本实验

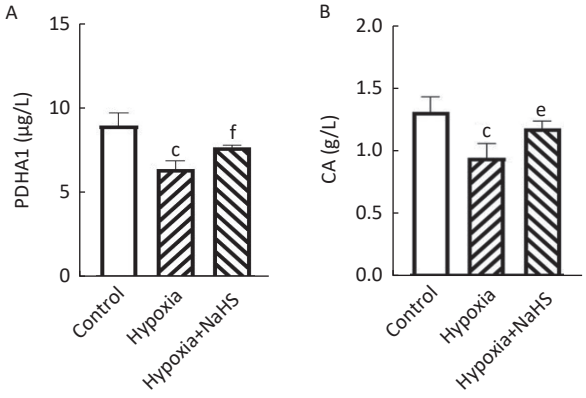


Fig.7　Expression levels of PDHA1 and CA concentrations in lung tissues of each group ($\bar{x}\pm s$,n=5)

A: expression level of PDHA1; B: expression level of CA. ^{c}P<0.01, comparedwith control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with Hypoxia group.

初步探讨铜死亡与肺动脉高压的关系，假设调控铜死亡可影响 HPH 的肺血管收缩。

铜离子在体内的存在形式主要有两种：一价亚铜离子（Cu^{+}，还原型）和二价铜离子（Cu^{2+}，氧化型）。铜离子从血液进入细胞内主要通过铜转运蛋白实现，Zhou 等[18]第一次发现高亲和力人铜转运蛋白 1（human copper transporter 1, hCTR1）基因是在 CTR1 缺陷的酵母功能互补实验中。CTR1 是铜离子转运过程中最重要的运输工具，也是铜离子进入细胞内进行物质代谢的前提条件[19]，而 ATP7A 和 ATP7B 会转运过量的铜离子到细胞外，以避免铜离子毒性的增加[20]。本实验结果显示，与 Control 组比较，Hypoxia 组大鼠肺组织中铜离子浓度显著升高，CTR1 蛋白表达含量显著升高而铜离子外排蛋白 ATP7A 和 ATP7B 表达显著降低，给予外源性 H_2S 后能显著降低铜离子浓度，逆转铜转运蛋白的表达。以上结果说明，外源性 H_2S 可缓解 HPH，可能与降低铜离子浓度，调节铜稳态失衡有关。

FDX1 是众所周知的代谢相关基因[21]，在人类细胞中，通过向各种细胞色素 P450 蛋白（例如 CYP11A1）提供电子来调节类固醇激素的合成。研究发现细胞内 Cu^{+}积累后，铜稳态平衡被打破，在线粒体呼吸过程的三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle, TCA）中产生作用，引起细胞死亡的关键基因是 FDX1。在这一过程中 FDX1 被消耗，一方面将 Cu^{2+}带入细胞还原成更具毒性的 Cu^{+}，抑制线粒体呼吸相关的铁硫簇蛋白的合成；另一方面，作

为蛋白质硫辛酰化修饰的上游调节因子，诱导这些蛋白聚集导致毒性应激，并干扰正常的 TCA 循环，最终导致细胞死亡[5,22]。DLAT、DLST 在铜死亡的发生过程中发挥重要作用，一方面作为丙酮酸脱氢酶的重要组分，其丢失会影响 TCA 进程[23]；另一方面可负责蛋白质的脂酰化，表现为 DLAT、DLST 单体减少，而过量的 Cu^+与脂酰化蛋白结合，诱导 DLAT 二聚体的产生，最终导致铁硫簇蛋白 FDX1、LIAS 的丢失和蛋白质毒性应激，导致细胞死亡。本实验结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组铜死亡相关指标 FDX1、LIAS、DLAT、DLST 水平显著降低而 DLAT 二聚体显著升高；给予外源性 H_2S 后铜死亡相关指标 FDX1、LIAS、DLAT、DLST 水平显著升高，DLAT 二聚体显著降低。以上结果说明，外源性 H_2S 可抑制 HPH 中的铜死亡。

铜是许多线粒体内重要酶类的辅因子，铜稳态失衡通过影响酶的活性造成线粒体的功能障碍[24]。线粒体是拥有双层膜包被的细胞器，即线粒体外膜（outermitochondrial membrane, OMM）和线粒体内膜（innermitochondrialmembrane, IMM）。IMM 主要与能量代谢有关，糖酵解是线粒体能量代谢途径之一，其最终产物丙酮酸可在丙酮酸脱氢酶的作用下转化为乙酰辅酶 A 并进入 TCA 循环[25]。另外，IMM 上有电子传递链（electron transport chain, ETC）的呼吸复合物，是 ATP 合成的主要位点[26]。线粒体发生功能障碍的过程中，ETC 复合物 Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ的电子转移活动与质子泵入线粒体膜间空间耦合，在 IMM 上产生电化学质子梯度，从而可以检测到线粒体膜电位的变化[25]。近年来，铜死亡作为一种新型的细胞死亡方式受到广泛关注，其特征是线粒体功能障碍和蛋白聚集，由细胞内铜离子水平升高所触发。研究表明，铜过载会引起线粒体结构损伤与功能紊乱，同时影响线粒体呼吸功能。本实验结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组 JC-1 和 ATP 含量显著降低，提示低氧条件下肺组织细胞存在线粒体功能障碍，这可能与铜稳态失衡有关。值得注意的是，有研究证实[27]铜离子载体处理后细胞内 ATP 合成量明显降低，与本研究中 Hypoxia 组 ATP 含量下降的趋势一致。

PDHA1 是丙酮酸脱氢酶复合体的关键组分，负责将糖酵解的终产物丙酮酸转化为乙酰辅酶 A，从而连接糖酵解与 TCA 循环。新近研究发现，PDHA1 是铜死亡的关键调节因子[28]，同时，PDHA1 的表达水平与细胞内乙酰辅酶 A 的生成密切相关，进而影响 TCA 循环通量。本实验结果显示，与 Control 组相比，Hypoxia 组 PDHA1 和 CA 浓度显著降低，表明 TCA 循环受阻，这一现象与铜死亡发生时 TCA 循环功能障碍的特征相吻合。

本实验结果显示，给予外源性 H_2S 后，线粒体功能指标 JC-1 和 ATP 显著升高，与 TCA 循环有关的 PDHA1 和 CA 浓度也显著升高。已有研究表明，H_2S 可影响细胞内铜离子的动态平衡，促进铜的细胞内蓄积。因此，外源性 H_2S 可能通过调节肺组织细胞内的铜稳态，缓解铜死亡相关的线粒体功能障碍和代谢紊乱。以上结果说明，HPH 发生过程中肺组织细胞线粒体功能、代谢紊乱，外源性 H_2S 缓解 HPH 的机制可能与改善细胞线粒体功能有关，这一作用可能涉及对铜死亡的调控。

综上所述，低氧可能导致肺组织细胞中的铜死亡，H_2S 处理可缓解 HPH，其机制可能通过 FDX1-铜死亡途径降低铜离子浓度，改善肺组织细胞中线粒体功能、代谢，进而缓解肺血管收缩。本研究在动物实验中初步探讨了 H_2S 保护大鼠 HPH 的作用及其潜在机制，其结果仍需进一步从离体实验中得到证实。

参考文献

[1] 李彦霖, 王一川, 吴剑华, 等. 伴肺动脉高压的系统性红斑狼疮患者肝损伤 1 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 365-368.

[2] Nakamura K, Akagi S, Ejiri K, et al. Pathophysiology of group 3 pulmonary hypertension associated with lung diseases and/or hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(2): 835.

[3] Bisserier M, Salami A, Zalavadia S, et al. Hypoxia-induced pulmonary hypertension in adults and newborns: implications for drug development [J]. Drug Discov Today, 2024, 29(6): 103978.

[4] Bogaard HJ, Mizuno S, Guignabert C, et al. Copper dependence of angioproliferation in pulmonary arterial hypertension in rats and humans [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(5): 582-591.

[5] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell

death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375(6586): 1254-1261.

[6] Cirino G, Szabo C, Papapetropoulos A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs [J]. Physiol Rev, 2023, 103(1): 31-276.

[7] Sun HJ, Lu Y, Zhu Y, et al. Pharmacology of hydrogen sulfide and its donors in cardiometabolic diseases [J]. Pharmacol Rev, 2024, 76(5): 846-895.

[8] Cobine PA, Brady DC. Cuproptosis: cellular and molecular mechanisms underlying copper-induced cell death [J]. Mol Cell, 2022, 82(10): 1786-1787.

[9] Hanna DA, Chen B, Shah YM, et al. H_2S remodels mitochondrial ultrastructure and destabilizes respiratory supercomplexes [J]. J Biol Chem, 2025, 301(5): 108433.

[10] Nomani L, Zehra A, Choudhary S, et al. Exogenous hydrogen sulphide alleviates copper stress impacts in Artemisia annua L: growth, antioxidant metabolism, glandular trichome development and artemisinin biosynthesis [J]. Plant Biol, 2022, 24(4): 642-651.

[11] Rai P, Singh VP, Peralta-Videa J, et al. Hydrogen sulfide (H_2S) underpins the beneficial silicon effects against the copper oxide nanoparticles (CuO NPs) phytotoxicity in Oryza sativa seedlings [J]. J Hazard Mater, 2021, 415: 124907.

[12] 程缘, 田云娜, 黄曼, 等. 硫化氢通过抑制有氧糖酵解-细胞焦亡改善大鼠低氧性肺动脉高压 [J]. 生理学报, 2025, 77(3): 465-471.

[13] 刘军杰, 黄国雄, 黎静, 等. 硫化氢对高肺血流性肺动脉高压大鼠平滑肌细胞线粒体损伤的保护作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2014, 40(3): 593-597.

[14] Zafeiropoulos S, Ahmed U, Bekiaridou A, et al. Ultrasound neuromodulation of an anti-inflammatory pathway at the spleen improves experimental pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2024, 135(1): 41-56.

[15] 罗勤. 中国肺动脉高压诊治临床路径 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(7): 691-703.

[16] Vonk NA, Channick R, Cottreel E, et al. The REPAIR study: effects of macitentan on RV structure and function in pulmonary arterial hypertension [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2022, 15(2): 240-253.

[17] Gutiérrez A, Gómez DA, Contreras C, et al. Calcium handling coupled to the endothelin ETA and ETB receptor-mediated vasoconstriction in resistance arteries: differential regulation by PI3K, PKC and RhoK [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 956: 175948.

[18] Zhou B, Gitschier J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(14): 7481-7486.

[19] Wen MH, Chen HH, Yan GJ, et al. Elevated intracellular copper induces CTR1 monomerization and prevents copper uptake [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 11500.

[20] 朱明强, 谢星, 廖启成, 等. 铜死亡的发生机制及在肝脏疾病中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(11): 2332-2337.

[21] Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, et al. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, FDX1 and FDX2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(26): 11775-11780.

[22] Dreishpoon MB, Bick NR, Petrova B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS [J]. J Biol Chem, 2023, 299(9): 105046.

[23] 任俏慧, 朱欣悦, 吕伟, 等. 伊利司莫-铜离子诱导肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 发生铜死亡 [J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(8): 1470-1477.

[24] Lairion F, Saporito-Magrina C, Musacco-Sebio R, et al. Nitric oxide, chronic iron and copper overloads and regulation of redox homeostasis in rat liver [J]. J Biol Inorg Chem, 2022, 27(1): 23-36.

[25] Klecker T, Westermann B. Pathways shaping the mitochondrial inner membrane [J]. Open Biol, 2021, 11(12): 210238.

[26] Thurakkal B, Hari K, Marwaha R, et al. Collective heterogeneity of mitochondrial potential in contact inhibition of proliferation [J]. Biophys J, 2023, 122(19): 3909-3923.

[27] 汪鸣, 赵信科, 刘生发, 等. 当归红芪超滤物含药血清对放射性 H9C2 心肌细胞铜死亡的干预效应 [J]. 四川中医, 2025, 43(3): 138-143.

[28] Zhuang R, Zhou Q, Cheng B, et al. PDHA1-acetylation signaling suppresses cuproptosis to attenuate anti-androgen effect in prostate cancer [J]. Cell Death Dis, 2026, 17(2): 245.

Chin J Clin Pharmacol Ther 2026 Jul; 31(7)

Intervention of hydrogen sulfide on FDX1-cuproptosis pathway in rats with hypoxemic pulmonary hypertension

WANG Shuyuan[1], HUANG Man[2], CHEN Sian[2], HAN Congmei[3], CHENG Yuan[2], YUAN Linbo[3], YE Huan[1], WANG Wantie[2]

[1] Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325400, Zhejiang, China; [2] Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China; [3] Department of Functional Medicine, School of Basic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

ABSTRACT **AIM**: To investigate whether hydrogen sulfide (H_2S) improves hypoxic pulmonary hypertension (HPH) in rats through the FDX1-cuproptosis pathway. **METHODS**: Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to the Control group; Hypoxia group and Hypoxia+NaHS group, with 10 rats in each group. Rats in the Control group were housed in a normoxic environment (21% O_2) and received a daily intraperitoneal injection of an equal volume of normal saline; rats in the Hypoxia group and Hypoxia+NaHS group were placed in hypoxic chambers and received a daily intraperitoneal injection of 14 μmol/kg NaHS. After 21 days of model establishment, the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) of each group was measured by right heart catheterization and the right ventricular hypertrophy index (RVHI) was calculated after weighing. The levels of endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI_2) were measured by ELISA. Copper ion concentration was detected by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The protein levels of copper transporter 1 (CTR1), copper-transporting ATPase α (ATP7A), copper-transporting ATPase β (ATP7B), ferredoxin 1 (FDX1), lipoic acid synthase (LIAS), dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT), dihydrolipoamide S-acetyltransferase dimer (DLAT Dimer) and dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST) were detected by Western blot. The mRNA expression levels of *FDX1*, *LIAS*, *DLAT* and dihydrolipoamide dehydrogenase (*DLD*) were detected by RT-qPCR. Mitochondrial membrane potential was assessed using the JC-1 kit. ATP content was measured by chemiluminescence. The level of pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1 (PDHA1) was measured by ELISA. Citric acid (CA) content was measured by the sulfosalicylic acid method. **RESULTS**: Compared with the Control group, the Hypoxia group showed significantly increased mPAP and RVHI; significantly elevated ET-1 concentration while NO and PGI_2 concentrations were significantly decreased; significantly increased copper ion concentration; significantly elevated expression of copper transporter 1 while the expressions of copper efflux proteins ATP7A and ATP7B were significantly decreased; the expressions of cuproptosis-related proteins FDX1, LIAS, DLAT and DLST were all significantly decreased, whereas the expression of DLAT dimer is significantly increased; the mRNA expression levels of *FDX1*, *LIAS*, *DLAT* and *DLD* were significantly decreased; the mitochondrial function indicators JC-1 and ATP levels were significantly decreased and the tricarboxylic acid cycle indicators PDHA1 and CA levels were significantly decreased (all $P<0.05$). Compared with the Hypoxia group, all the above changes in the Hypoxia+NaHS group were significantly reversed by the therapeutic agent NaHS. **CONCLUSION**: H_2S may regulate the FDX1-cuproptosis pathway, thereby affecting mitochondrial function and metabolism in lung tissue cells, alleviating pulmonary vasoconstriction and ameliorating pulmonary hypertension.

KEYWORDS copper ion; pulmonary arterial hypertension; cuproptosis; hydrogen sulfide