

·基础研究·

## 缺血缺氧环境下葡萄糖转运蛋白1 对人脐静脉内皮细胞功能的调控作用

李美玲<sup>1</sup>, 高锶琦<sup>1</sup>, 刘哲夫<sup>2</sup>, 廖欢燕<sup>1</sup>, 刘繁茂<sup>2</sup>, 夏文豪<sup>2</sup>, 郭军<sup>1</sup>, 李琰<sup>1</sup>

(1. 暨南大学附属第一医院心内科, 广东广州 510630; 2. 中山大学附属第一医院高血压与血管病科//国家卫生健康委辅助循环及血管相关疾病重点实验室, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】本研究旨在探讨葡萄糖转运蛋白1 (GLUT1) 在缺血缺氧环境下对人类脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 增殖、迁移、粘附和血管形成的影响及其调控作用。【方法】通过体外实验, 将 HUVECs 置于模拟缺血缺氧的环境中 (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>), 对比分析了常氧与缺血缺氧条件下 HUVECs 的生物学特性, 通过检测细胞活性、细胞增殖能力以及利用 Western blot 技术比较缺血缺氧条件下 GLUT1、HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 蛋白的表达变化。进一步采用质粒转染技术过表达 GLUT1, 并通过划痕实验、细胞粘附实验和管状结构形成实验来评估 HUVECs 的增殖、迁移、粘附和血管形成能力, 透射电镜观察线粒体形态变化, Seahorse 代谢分析仪检测氧消耗率 (OCR) 以评估线粒体功能。【结果】与常氧条件相比, 缺血缺氧环境显著抑制了 HUVECs 的增殖、细胞活性、迁移和粘附能力, 并损害了其血管形成能力。同时, GLUT1、HIF-1 $\alpha$  及 VEGFA 蛋白的表达均显著降低。而在上调 GLUT1 表达的情况下, HUVECs 的迁移、粘附和血管形成能力得到明显改善, 同时 HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 的蛋白表达量也增加。透射电镜显示, 缺血缺氧导致线粒体肿胀和基质损伤, 而 GLUT1 过表达显著缓解线粒体形态异常。OCR 结果表明, GLUT1 过表达可增强缺血缺氧环境下内皮细胞氧化磷酸化从而改善能量代谢。这些结果提示 GLUT1 可能通过调节葡萄糖代谢和能量供应, 影响 HUVECs 的功能和血管生成能力。【结论】本研究揭示了 GLUT1 在缺血缺氧环境下对 HUVECs 功能的重要调控作用, 这种调控可能通过调节细胞能量代谢和信号传导途径, 进而影响细胞增殖、迁移、粘附和血管形成。这些发现为理解 GLUT1 在心血管疾病中的作用提供了新的视角, 并可能为开发新的治疗策略提供潜在的靶点。

**关键词:** 葡萄糖转运蛋白1; 缺血缺氧环境; 血管形成; 内皮细胞; 能量供应

中图分类号: R543

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2025)03-0444-12

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ.(med.sci).2025.0309

### The Regulatory Role of Glucose Transporter 1 on the Function of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Under Ischemia-hypoxic Conditions

LI Meiling<sup>1</sup>, GAO Siqi<sup>1</sup>, LIU Zhefu<sup>2</sup>, LIAO Huanyan<sup>1</sup>, LIU Fanmao<sup>2</sup>, XIA Wenhao<sup>2</sup>, GUO Jun<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Hypertension and Vascular Disease, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University// NHC Key Laboratory of Assisted Circulation and Vascular Diseases, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: GUO Jun, E-mail: dr.guo.jun@163.com; LI Yan, E-mail: ly7620@163.com

**Abstract:** [Objective] The study aims to explore the effects and regulatory roles of glucose transporter 1 (GLUT1) on the proliferation, migration, adhesion, and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

收稿日期: 2025-01-02

录用日期: 2025-04-08

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金-青年基金 (2020A1515111139); 国家自然科学基金 (82100430, 82270458, 82470456, 32171335)

作者简介: 李美玲, 第一作者, 研究方向: 缺血性血管疾病、能量代谢, E-mail: limeiling0194@163.com; 郭军, 通信作者, 博士生导师, E-mail: dr.guo.jun@163.com; 李琰, 通信作者, 硕士生导师, E-mail: ly7620@163.com

(HUVECs) under ischemia-hypoxic conditions.【Methods】 *In vitro* experiments were conducted to subject HUVECs to an ischemia-hypoxic-mimicking environment (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>). The biological characteristics of HUVECs under normoxic and ischemia-hypoxic conditions were compared by assessing cell viability, proliferation capacity, and examining the expression changes of GLUT1, HIF-1 $\alpha$ , and VEGFA proteins under ischemia-hypoxia using Western blot technology. Further, GLUT1 was overexpressed using plasmid transfection and the proliferation, migration, adhesion, and angiogenic capabilities of HUVECs were evaluated through scratch assays, cell adhesion assays, and tube formation assays. Mitochondrial morphological changes were observed by transmission electron microscopy, and oxygen consumption rate (OCR) was detected by Seahorse metabolic analyzer to evaluate mitochondrial function.【Results】 Compared with normoxic conditions, the ischemia-hypoxic environment significantly inhibited the proliferation, cell viability, migration, and adhesion capabilities of HUVECs and impaired their angiogenic potential. The expression levels of GLUT1, HIF-1 $\alpha$  and VEGFA proteins were also markedly reduced. However, when GLUT1 expression was upregulated, the migration, adhesion, and angiogenic capabilities of HUVECs were significantly improved, and the protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGFA and VEGFR were increased. Transmission electron microscopy revealed that ischemic-hypoxia leads to mitochondrial swelling and matrix damage, while GLUT1 overexpression significantly alleviates mitochondrial morphology abnormalities. OCR results suggest that GLUT1 overexpression may enhance oxidative phosphorylation of endothelial cells in ischemic-hypoxic environments to improve energy metabolism. These results suggest that GLUT1 may influence the function and angiogenic potential of HUVECs by regulating glucose metabolism and energy supply.【Conclusions】 This study reveals the significant regulatory role of GLUT1 in the function of HUVECs under ischemia-hypoxic conditions, potentially through modulating cellular energy metabolism and signal transduction pathways, thereby affecting cell proliferation, migration, adhesion, and angiogenesis. These findings provide a new perspective on the role of GLUT1 in cardiovascular diseases and may offer potential targets for the development of new therapeutic strategies.

**Key words:** glucose transporter 1; ischemia-hypoxic environment; angiogenesis; endothelial cells; energy supply

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(3): 444-455]

在过去的几十年中,缺血性疾病一直是全球范围内的主要健康问题之一,这类疾病包括心血管疾病、中风和糖尿病等。这些疾病的显著性特征之一是局部组织的缺血和缺氧,这会导致内皮细胞功能障碍,进一步影响血管新生和组织修复<sup>[1]</sup>。内皮细胞是血管系统的基石,它们不仅构成血管的内层,还参与调节血管张力、炎症反应和血管新生<sup>[2]</sup>。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)作为血管内皮细胞的代表,是研究血管生成、炎症反应和血管通透性变化的关键模型<sup>[3]</sup>。特别是在缺血和缺氧环境下, HUVECs的行为和功能变化对于理解相关疾病的发生和发展具有至关重要<sup>[4]</sup>。缺血和缺氧是一种常见的病理状态,广泛存在于心肌梗死、脑卒中、肿瘤等多种疾病中,这种状态能显著影响血管内皮细胞的生物特性,包括细胞的增殖、迁移、粘附和血管形成等。因此,寻找能够改善缺血和缺氧环境下内皮细胞功能的方法,对于治疗缺血性疾病极为重要<sup>[5-6]</sup>。葡萄

糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)是位于细胞膜上的一种蛋白质,负责将葡萄糖从细胞外转运到细胞内,其表达和活性的变化对于维持细胞的能量代谢和功能至关重要<sup>[7-8]</sup>。近年来, GLUT1在多种细胞类型中的功能引起了广泛关注,已有研究表明<sup>[9]</sup>, GLUT1不仅在正常细胞的能量代谢中发挥作用,还涉及细胞信号传导和血管生成的调控,尤其是在缺血和缺氧条件下扮演着更为重要的角色<sup>[10]</sup>。研究表明<sup>[11-12]</sup>, GLUT1的表达和活性受到多种因素的调控,包括缺氧、氧化应激和细胞代谢状态。在缺血和缺氧环境下, GLUT1可能通过影响HUVECs的代谢状态和信号传导途径,进而调控其增殖、迁移、粘附和血管形成的能力。然而, GLUT1在这一过程中的具体作用尚不清晰。因此,本研究旨在探讨 GLUT1在缺血和缺氧环境下对 HUVECs增殖、迁移、粘附和血管形成能力的调控作用。我们假设通过调节 GLUT1的表达,可以改善 HUVECs在缺血和缺氧条件下的功能,这或将为相关疾病的

治疗提供新的靶点和理论依据。研究将涉及 GLUT1 在 HUVECs 中的表达模式, 以及其在缺血缺氧条件下对 HUVECs 功能的影响, 特别是其在血管生成中的作用。通过深入分析 GLUT1 的功能和调控机制, 我们可以更好地理解其在血管疾病中的作用, 并为开发新的治疗策略提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞购自 ICell Bioscience Inc 公司。缺氧培养罐(UT208)购自尤德生物公司, 智能厌氧培养系统(Anoxomat MARK III)购自安达望公司; 40 g/L 多聚甲醛通用型组织固定液(BL539A)购自白鲨公司; PAGE 凝胶制备试剂盒(PG112, PG113-1)购自雅酶公司; RIPA 完全缓冲液(强)(P0038)购自碧云天公司; Pierce™ BCA 蛋白定量试剂盒(23227)购自赛默飞公司; RNA 快速提取试剂盒(B0004D)购自 EZBioscience 公司; BeyoClick™ EdU-647 细胞增殖检测试剂盒购自碧云天; ABW 金牌基质胶(082704)购自阿普斯戴尔公司; CCK-8 试剂盒(CK18)购买自东仁公司; 细胞培养小室(353097)购自康宁公司。胰酶细胞消化液(2.5 mL/L 胰酶, 含酚红)(C0203)购自新赛美公司; 在抗体方面, 兔源 GLUT1(21829-1-AP)购自 Proteintech 公司; 兔源 VEGFA(AF5131)、抗兔 IgG(S0001)购自 Affinity 公司; 抗鼠 IgG 兔源 HIF-1 $\alpha$ (A22041)购自爱博泰克公司; Alexa Fluor 647 标记山羊抗兔 IgG(H+L)购自碧云天公司。

### 1.2 细胞培养及缺血缺氧模型

在含有 100 mL/L 胎牛血清, 10 mL/L 内皮生长因子, 10 mL/L 青霉素/链霉素溶液的 ECM 培养基中培养细胞, 置于 37 °C, 体积分数 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞到达对数生长期的时候, 在超净工作台中用 2.5 mL/L 胰酶消化并将其种于六孔板。接下来, 构建缺血缺氧模型, 当细胞覆盖 80%~90% 的培养板表面时, 将培养基换为 1640 培养基, 并将培养板移至 37 °C, 体积分数 1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> 和 94%N<sub>2</sub> 的缺氧培养箱中进行 24 h 的缺氧培养 24 h 后, 收集细胞用于后续实验。

### 1.3 CCK-8 实验检测细胞活性

根据 CCK-8 实验操作流程, 在超净工作台中我们首先取处于生长对数期的人脐静脉内皮细胞悬液, 以 100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板。随后, 我们将培养板置于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 和 95%O<sub>2</sub> 培养箱培养, 待细胞融合度达到 80%~90% 时移至 37 °C, 体积分数 1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub> 缺氧培养箱中缺氧培养 24 h, 24 h 后将细胞移至超净工作台, 向每孔中加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液, 将培养板放回 37 °C, 体积分数 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4 h。4 h 后用酶标仪(TECAN Sunrise)测定在 450 nm 处的吸光度。细胞活性的计算公式: 细胞存活率=(实验组细胞 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组细胞 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

### 1.4 5-乙炔-2-脱氧尿苷荧光标记(Edu)增殖实验

在 6 孔板中培养细胞悬液, 当细胞融合度达到 80%~90% 时, 将细胞分为常氧和缺氧两组, 每组 3 个重复孔。对缺氧组进行处理后, 移除旧的培养基, 加入含有 20  $\mu$ mol/L Edu 的培养基, 继续培养 2 h。之后, 移除培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。接着, 使用 40 g/L 多聚甲醛通用型组织固定液固定细胞 20 min, 每次 5 min, 加入 Triton X-100 通透处理, 室温下孵育 15 min, 再用洗涤液洗细胞 3 次, 每次 5 min。接下来, 加入 1 mL DAPI, 室温下孵育 20 min, 之后去除 DAPI, 并用洗涤液洗细胞 3 次, 每次 5 min。最后, 使用抗荧光淬灭封片液进行封片, 完成上述实验步骤后, 在荧光显微镜(Leica DM18)下观察和分析 Edu 阳性细胞指数, 并进行统计分析:

细胞增殖数=每个视野下增殖细胞的数量;

细胞增殖率=(每个视野下增殖细胞的数量/显微镜每个视野下总细胞核数)×100%

### 1.5 细胞免疫荧光

将细胞接种至含有细胞爬片的培养板中, 并在细胞贴壁后对其进行缺氧处理。处理后, 弃去培养基, 使用 PBS 对细胞进行清洗, 接着使用 40 g/L 多聚甲醛通用型组织固定液固定细胞 20 min。之后, 用免疫染色洗涤液清洗细胞, 然后使用 QuickBlock™ 免疫染色封闭液在室温下封闭 1 h。接下来, 向细胞中滴加 1:400 的 GLUT1 抗体, 并在 4 °C 摇床孵育过夜。第 2 天用洗涤液洗细胞 3

次,每次5 min,然后向细胞中滴加1:200稀释的Alexa Fluor 647标记的山羊抗兔IgG(H+L)抗体,在室温下避光孵育1 h。后续所有步骤都应避光进行。用洗涤液清洗细胞后,向细胞中滴加DAPI以染色细胞核,孵育20 min。最后,用洗涤液清洗细胞3次,每次5 min,最后向细胞中滴加荧光淬灭剂进行封片,在荧光显微镜(Leica DMI8)下观察并随机选取5个视野拍照,实验Image J软件定量分析荧光强度。

### 1.6 质粒转染

首先,准备GLUT1过表达质粒使用Pcmv-hGlut1-3Flag(简称GLUT1 OE)和阴性对照质粒pCMV-3Flag,浓度均为50 ng/mL。然后,将人脐静脉内皮细胞种于6孔板,待细胞融合度达50%~60%时,弃去旧培养基,用PBS清洗1次。接着,加入无血清的ECM,根据转染试剂lipofectamine™ 3000说明书,使用Opti-MEN™培养基稀释质粒DNA和lipofectamine™ 3000,室温静置5 min后将质粒DNA和lipofectamine™ 3000混合,再次室温静置15 min。之后,将混合物加入细胞培养板中,进行6 h的转染,转染完成后,更换完全培养基,继续培养48 h。最后,通过Western blot和RT-PCR实验检测过表达效果。

在成功构建GLUT1过表达模型后,将细胞分为不同实验组,分别加入终浓度为50 μg/mL的VEGFA中和抗体Bevacizumab、10 μmol/L的VEGFR抑制剂SU5416,以及10 μmol/L的HIF-1α抑制剂YC-1,对各组细胞进行24 h的预处理。完成预处理后,对所有实验组细胞统一进行缺血缺氧处理,以便后续探究相关通路变化及细胞生理特性改变。

### 1.7 基质胶小管形成实验

在实验开始的前1 d,将储存在-20 °C冰箱中取出Matrigel取出,并放置在4 °C冰箱中融化。实验当天,把融化的Matrigel放在冰上,并在96孔板上垂直加入60 μL Matrigel到每个孔中,每组设计3个重复孔,添加完成后轻轻摇晃使胶均匀分布,然后放在37 °C的培养箱中放置1 h,以便其完全凝固。完成细胞缺氧处理后,用胰酶消化细胞并将其重悬,随后进行细胞计数并调整浓度为 $1 \times 10^4$ 个/mL,将200 μL细胞悬液垂直滴加到已凝固的Matrigel

上。在6 h后,使用倒置显微镜观察并拍照记录,最后使用Image J图像分析软件对小管进行分析。

### 1.8 Western blot 实验

首先弃去培养板中的培养基,并用PBS溶液清洗细胞2次。接着,向细胞中加入预先配置好的蛋白裂解液(RIPA:PMSF=100:1),将培养板置于冰上以充分裂解15 min。之后,用细胞刮将培养板底部的细胞刮下来,并收集到EP管中,将该混合物在4 °C条件下以 $15\ 000 \times g$ 离心15 min,以沉淀裂解后的细胞成分。离心完成后,小心吸取上清液转移至新的EP管中,并根据BCA蛋白浓度测定试剂盒的说明进行蛋白浓度的测定。测定蛋白后,向蛋白样品中加入1/4体积的loading buffer,涡旋混匀,后于金属浴100 °C 8 min以进行蛋白变性处理。变性后的蛋白样品加入凝胶电泳的上样孔中,并加入电泳缓冲液,初始以80V的恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂移动至浓缩胶与分离胶交界处形成线状,随后改为120 V的恒压以完成电泳过程。电泳完成后,将凝胶转移至预先处理好的PVDF膜上,并倒入预冷的转膜液,使用250 mA的恒流电流转移60 min,以确保蛋白转移到PVDF膜上。转膜后,将PVDF膜置于快速封闭液中室温下封闭30 min,然后加入一抗(rabbit anti-GLUT1, rabbit anti-HIF-1α, rabbit anti-VEGFA, rabbit anti-VEGFAR, 稀释比例均为1:1 000),并在4 °C下孵育过夜以进行免疫反应。第2天用TBST溶液清洗PVDF膜30 min,随后加入稀释好的二抗,室温下继续孵育1 h,再次用TBST溶液清洗PVDF膜30 min后,配置ECL发光液,使用Amersham Imager 600成像系统对PVDF膜上的蛋白印迹进行显影。最后,利用Image J软件对目的条带进行定量分析,以β-actin作为内参,以确保实验结果的准确性和可靠性。

### 1.9 细胞总RNA提取、逆转录和RT-PCR

弃去培养基,用PBS清洗细胞3次,根据RNA快速提取试剂盒说明书进行操作,加入500 μL裂解液,吹打30下左右,然后加入等体积无水乙醇,充分混匀,将混合液加入离心柱离心1 min,最后向离心柱中央加入20 μL洗脱液,室温静置2 min, $12\ 000 \times g$ 离心1 min,弃去离心柱,将所得RNA在NanoDrop 2000进行RNA浓度检测,再根据RNA逆转录试剂盒操作说明书对RNA进行逆转录得到

cDNA,最后对 cDNA 进行 RT-PCR 扩增,使用 BioRadCFX Manage 进行数据初步分析。本文所用引物均由通用生物公司,具体引物序列见附表 1。

### 1.10 统计学分析

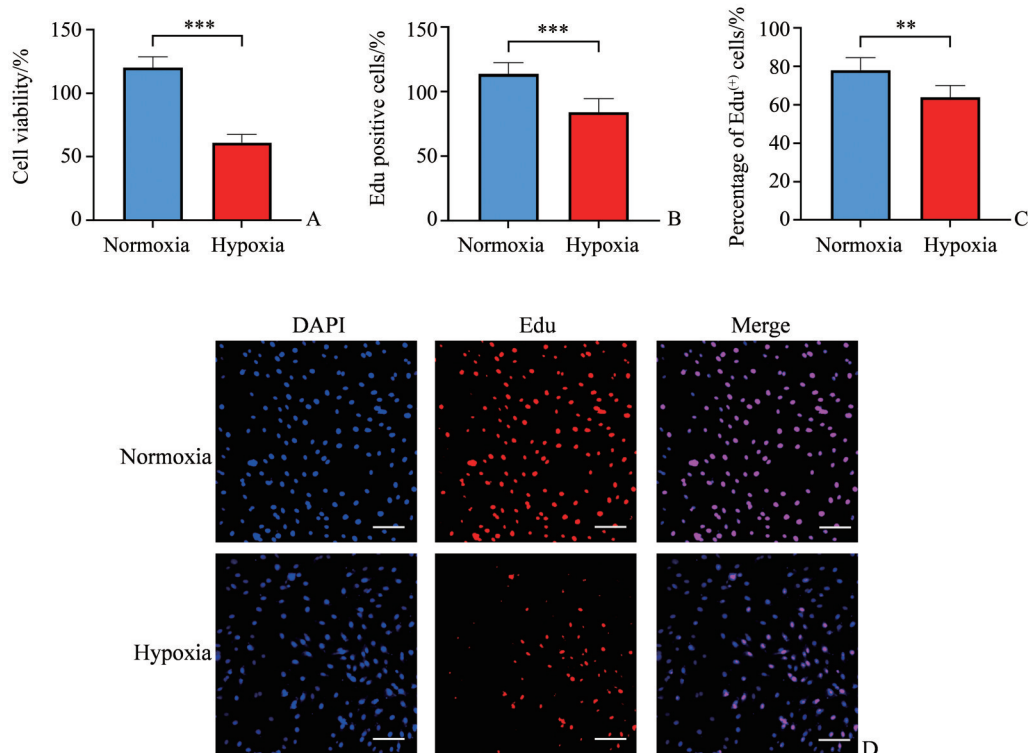
数据以平均值 $\pm$ 标准差(SD)的形式表示,本研究采用 GraphPad Prism(版本 9.0)软件进行数据分析,当为两组计量资料时,如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性,组间比较应采用 *t* 检验;若资料呈正态分布但方差不齐,此时可采用校正 *t* 检验或秩和检验。对于多组计量资料,若各组定量资料都呈正态分布并且方差齐性,采用单因素方差分析进行分析;而当多组计量资料为非正态分布,且不满足方差齐性的情况时,则采用 Kruskal Wallis H 检验或使用 Welch's anova。本研究中的所有实验均独立重复 3 次,以保证结果的可靠性。在统计

中,我们将  $P < 0.05$  时作为差异具有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 HUVECs 在缺血缺氧刺激下细胞活力减弱、增殖减少

为了探究 HUVECs 在体外缺血缺氧干预下细胞的活力,我们将其进行了 24 h 的缺血缺氧后,细胞的活力显著降低( $61 \pm 4$  比  $120 \pm 5$ ,  $t=9.368$ ,  $P=0.0007$ ;图 1A)。此外,Edu 增殖实验也证实了在缺血缺氧处理后,与常氧组相比,HUVECs 增殖细胞个数在单个视野下下降了约 60 个,平均增殖比率也相应降低 23.17% ( $64 \pm 3$  比  $78 \pm 3$ ,  $t=3.838$ ,  $P=0.0033$ ,图 1B,1C)。



A: CCK-8 assay to detect the effects of normoxia and ischemia-hypoxic intervention on cell viability. B, C: Quantitative analysis of the number of proliferating HUVECs and the proliferation rate of cells.  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ . Data are shown as mean $\pm$ SD. D: Edu assay to detect the proliferation of HUVECs with cell nuclei appearing blue, proliferating cells appearing red and the white scale bar representing 200  $\mu\text{m}$ .  $n = 3$ .

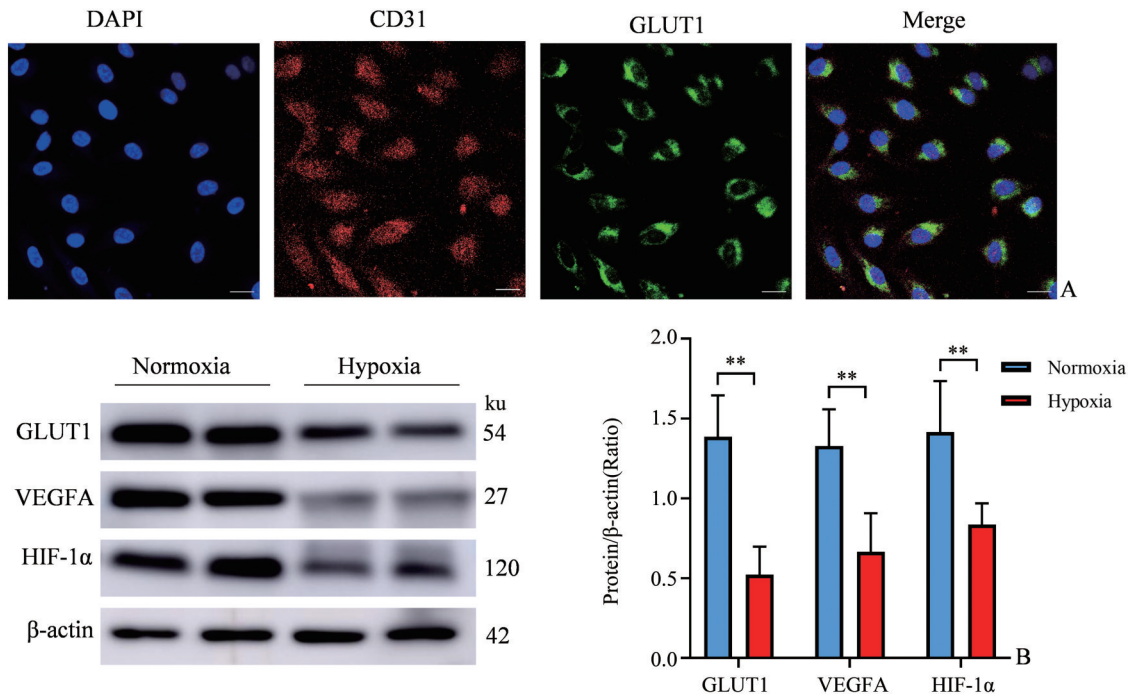
图 1 缺血缺氧对 HUVECs 的影响

Fig. 1 Ischemia-hypoxia effects on HUVECs

## 2.2 缺血缺氧刺激 HUVECs 中 GLUT1、VEGFA、HIF-1 $\alpha$ 的表达

我们通过免疫荧光染色技术观察到 HUVECs 中的 GLUT1 蛋白在细胞膜和细胞质中均有表达(图 2A)。进一步的 Western blot 分析揭示了,在缺血缺氧刺激下, HUVECs 中的 GLUT1 的相对表达量与常氧组相比显著下降( $1.005\pm 0.062$  比  $1.219\pm$

$0.021$ ,  $t=3.251$ ,  $P=0.0087$ , 图 2B), 与此同时, 我们亦观察到 VEGFA 和 HIF-1 $\alpha$  在缺血缺氧组的相对蛋白表达量相对于常氧组呈现下调趋势(VEGFA:  $0.698\pm 0.113$  比  $1.328\pm 0.094$ ,  $t=4.296$ ,  $P=0.0016$ ; HIF-1 $\alpha$ :  $0.836\pm 0.054$  比  $1.415\pm 0.130$ ,  $t=4.1$ ,  $P=0.0021$ , 图 2B)。



A: Representative confocal microscopy images of staining with anti-GLUT1 (green) and anti-CD31 (red) in HUVECs. Scale bar=20  $\mu$ m; B: Protein expression of GLUT1, VEGFA, HIF-1 $\alpha$  in HUVECs by Western blot assay. \*\* $P < 0.01$ . Data are shown as mean $\pm$ SD,  $n=3$ .

图2 缺血缺氧刺激 HUVECs 中 GLUT1、VEGFA、HIF-1 $\alpha$  的表达

Fig. 2 Expression changes of GLUT1, VEGFA, and HIF-1 $\alpha$  after ischemia and hypoxia

## 2.3 刺激 GLUT1 表达后 HUVECs 的迁移、粘附、成管能力增加

在质粒转染后的 48 h, 通过 Western blot 和 RT-PCR (图 3A、B) 检测发现, 转染了 Pcmv-hGlut1-3Flag 组的 HUVECs 中 GLUT1 蛋白和基因表达有所提升(蛋白:  $1.478\pm 0.236$  比  $0.767\pm 0.066$ ,  $t=2.902$ ,  $P=0.044$ ; 基因:  $8.33\pm 0.75$  比  $1.0\pm 0.11$ ,  $t=9.648$ ,  $P=0.0006$ , 图 3A、B), 这表明质粒能够有效促进目标蛋白 GLUT1 的表达。

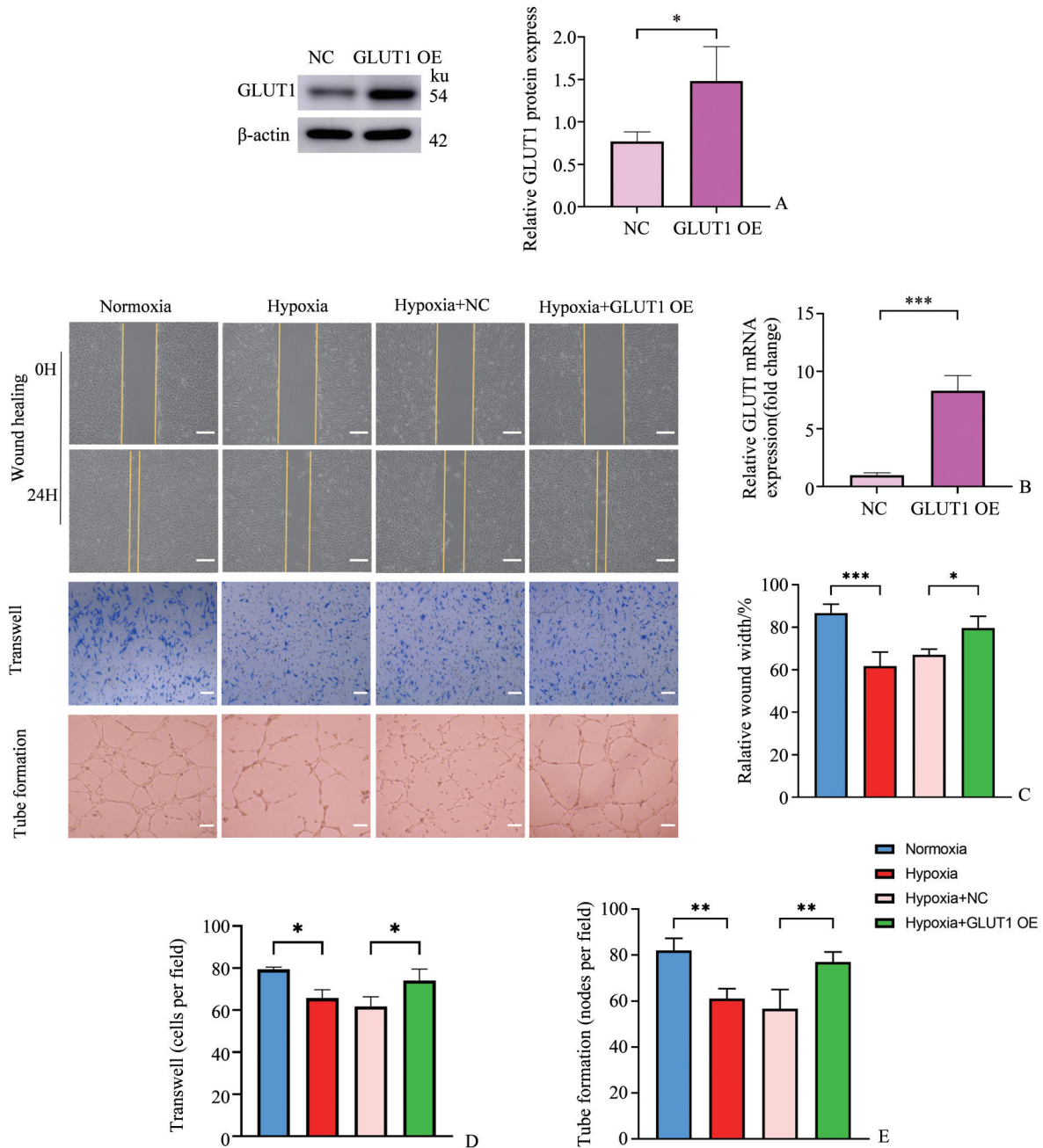
划痕迁移实验结果显示, 随着时间的推移, HUVECs 的迁移面积逐渐增加。经单因素方差分析, 4 组间差异有统计学意义 ( $F=15.9$ ,  $P=0.001$ ); 采用 Bonferroni 法进一步作两两比较, 发现缺血缺氧

组与常氧比较差异有统计学意义 ( $P=0.0008$ ), 而与 pCMV-3Flag 空载体 (NC) 组无统计学意义 ( $P=0.6768$ ), Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体 (NC) 组差异有统计学意义 ( $P=0.0428$ ; 图 3C)。

Transwell 实验结果表明, 经单因素方差分析, 4 组间差异有统计学意义 ( $F=10.77$ ,  $P=0.0035$ ); 采用 Bonferroni 法进一步作两两比较, 发现缺血缺氧组与常氧比较差异有统计学意义 ( $P=0.0123$ ), 而与 pCMV-3Flag 空载体 (NC) 组差异无统计学意义 ( $P=0.8353$ ), Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体 (NC) 组差异有统计学意义 ( $P=0.0214$ ; 图 3D)。

为了研究 GLUT1 在缺血缺氧条件下对 HUVECs 体外血管形成的影响,我们进行了 Matrigel 基质胶管形成实验。实验数据显示,经单因素方差分析,4 组间差异有统计学意义( $F=14.84$ ,  $P=0.0012$ );采用 Bonferroni 法进一步作两两

比较,发现缺血缺氧组与常氧比较差异有统计学意义( $P=0.0033$ ),而与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异无统计学意义( $P=0.198$ ),Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异有统计学意义( $P=0.0285$ ;图 3E)。



A: Protein expression of GLUT1 in HUVECs by Western blot assay. B: mRNA expression of GLUT1 in HUVECs by RT-qPCR assay. C: Migration activity of HUVECs by wound healing assay, scale bar is 50  $\mu$ m. D: Transwell assays were used to detect the migration of HUVECs, scale bar is 200  $\mu$ m. E: Tube formation assays were used to detect the formation of capillary-like tubules by HUVECs after different treatments, scale bar is 50  $\mu$ m. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Data are shown as mean $\pm$ SD,  $n=3$ .

图3 质粒刺激 GLUT1 过表达后对 HUVECs 迁移、粘附及血管形成的影响

Fig. 3 The impact of plasmid-induced GLUT1 overexpression on HUVECs' migration, adhesion and angiogenesis

## 2.4 刺激 GLUT1 表达后减弱了缺血缺氧对 HUVECs 的抑制作用

为深入研究过表达 GLUT1 在缺血缺氧过程中的作用,我们进行了 Western blot 实验,结果表明,在常氧条件下,与阴性对照组相比,敲低 GLUT1 显著下调了 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 及 VEGFR 的蛋白表达水平 (GLUT1:  $t=9.613$ ,  $P=0.000\ 7$ ; HIF-1 $\alpha$ :  $t=11.91$ ,  $P=0.000\ 3$ ; VEGFA:  $t=6.899$ ,  $P=0.002\ 3$ ; VEGFR:  $t=7.458$ ,  $P=0.001\ 7$ ; 图 4A)。而在缺血缺氧条件下,与阴性对照组相比,过表达 GLUT1 可显著逆转缺氧诱导的 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA 及 VEGFR 蛋白表达抑制 (GLUT1:  $t=7.8$ ,  $P=0.001\ 4$ ; HIF-1 $\alpha$ :  $t=10.11$ ,  $P=0.000\ 5$ ; VEGFA:  $t=6.124$ ,  $P=0.003\ 6$ ; VEGFR:  $t=11.02$ ,  $P=0.000\ 4$ ; 图 4B)。这提示缺血缺氧可能通过调节内皮细胞中的 GLUT1 来调控血管新生能力。透射电镜观察发现,缺血缺氧导致线粒体数量减少并出现基质肿胀,部分还与溶酶体融合,而 GLUT1 过表达后,线粒体的肿胀现象得到缓解,并且出现小体积线粒体(图 4C)。为了进一步分析 GLUT1 在缺血缺氧环境下能量代谢的特点,我们对比了常氧、缺氧与 GLUT1 过表达的 HUVECs 的氧消耗率(oxygen consumption rate, OCR),结果显示,与常氧组相比,缺血缺氧显著降低了 HUVECs 氧化磷酸化能力,然而, GLUT1 过表达后, HUVECs 氧化磷酸化能力有所恢复(图 4E-G)(呼吸水平基础值:经单因素方差分析,4 组间差异有统计学意义,  $W=8.662$ ,  $P=0.040\ 8$ , 采用 Dunett's T3 法进一步作两两比较,发现缺血缺氧组与常氧比较差异有统计学意义 ( $P=0.022\ 7$ ),而与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异无统计学意义 ( $P=0.98$ ), Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异无统计学意义 ( $P=0.99$ );呼吸能力最大值:  $W=54.77$ ,  $P=0.002\ 1$ , 采用 Dunett's T3 法进一步作两两比较,发现缺血缺氧组与常氧比较差异有统计学意义 ( $P=0.002\ 5$ ),而与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异无统计学意义 ( $P=0.780\ 3$ ), Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异有统计学意义 ( $P=0.036\ 5$ );呼吸能力储备值:  $W=8.662$ ,  $P=0.040\ 8$ , 采用 Dunett's T3 法进一步作两两比较,发现缺血缺氧组与常氧组和 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异均无统计学

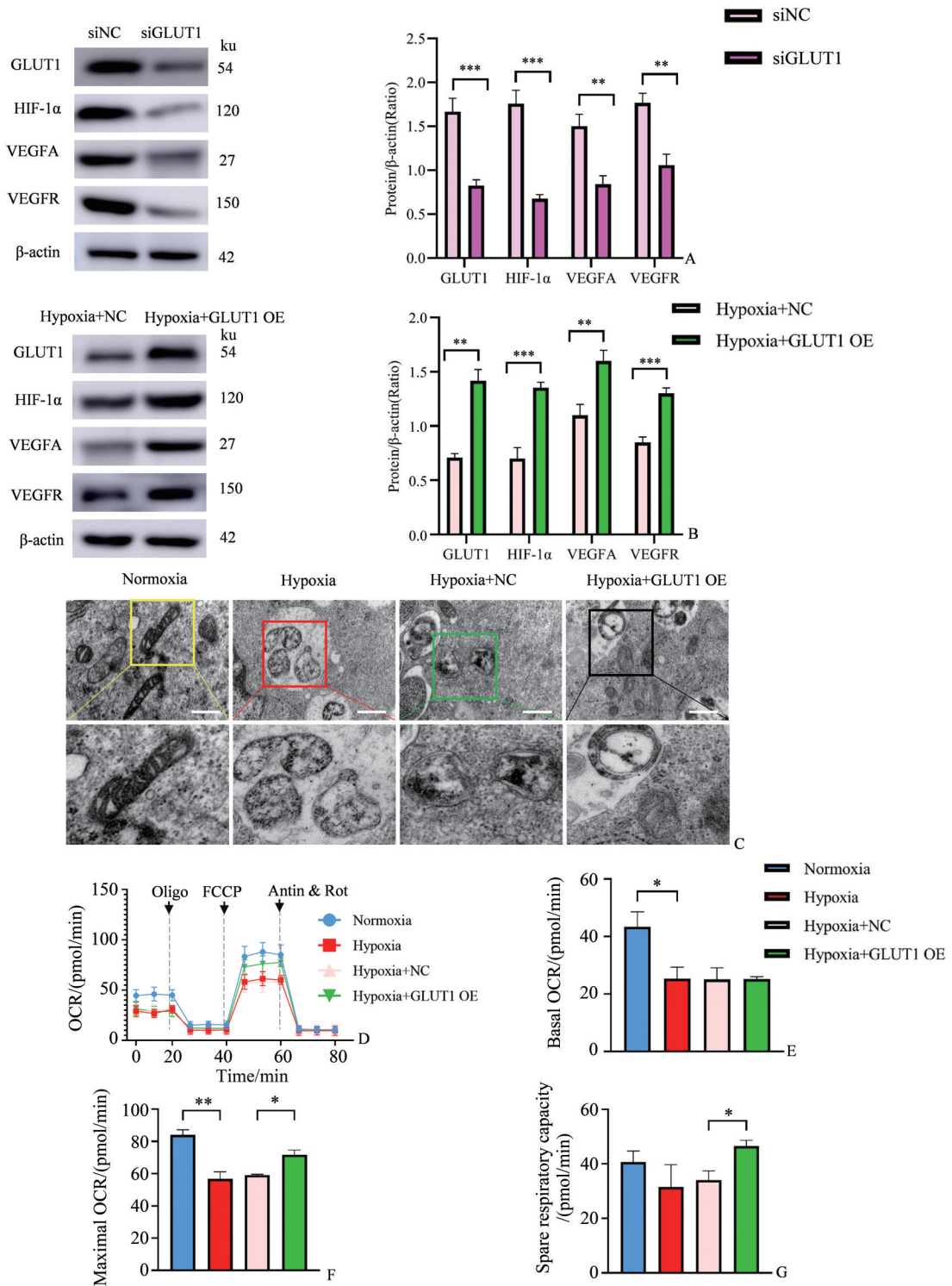
意义 ( $P=0.383\ 3$ ,  $P=0.946\ 1$ ), Pcmv-hGlut1+缺血缺氧组与 pCMV-3Flag 空载体(NC)组比较差异有统计学意义 ( $P=0.030\ 4$ )。

## 2.5 GLUT1 通过调控 HIF-1 $\alpha$ -VEGFA/VEGFR-轴增强 HUVECs 葡萄糖代谢与血管生成功能

为了验证 HIF-1 $\alpha$  对 HUVECs 中 VEGFA 和 VEGFR 表达的调控作用,以及 GLUT1 是否通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR 轴介导 HUVECs 的功能,我们进行了以下实验。首先,通过 Western blot 检测发现,与阴性对照组相比,敲低 HIF-1 $\alpha$  显著降低了 VEGFA 和 VEGFR 的蛋白表达水平 (VEGFA:  $t=6.556$ ,  $P=0.002\ 8$ ; VEGFR:  $t=4.11$ ,  $P=0.014\ 7$ ; 图 5A),表明 HIF-1 $\alpha$  正向调控 VEGFA 和 VEGFR 的表达。为进一步探讨 GLUT1 是否通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR 轴调控 HUVECs 的功能,首先对 GLUT1 进行过表达后,分别向细胞加入 VEGFA 中和抗体 Bevacizumab、VEGFR 抑制剂 SU5416 和 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 YC-1 对细胞进行预处理,将细胞置于缺血缺氧环境中持续处理 24 h,完成上述操作后,依次开展细胞划痕实验和血管成形实验。单因素方差分析显示,4 组间差异具有统计学意义(细胞划痕实验:  $F=11.72$ ,  $P=0.002\ 7$ ; 成管实验:  $F=9.07$ ,  $P=0.005\ 9$ )。进一步采用 Bonferroni 法进行两两比较,结果显示:细胞划痕实验: Hypoxia + GLUT1 过表达组分别与 GLUT1 过表达 + Bevacizumab 组 ( $P=0.012\ 4$ )、GLUT1 过表达 + SU5416 组 ( $P=0.003\ 4$ ) 和 GLUT1 过表达 + YC-1 组 ( $P=0.002\ 3$ ) 相比,差异均具有统计学意义(图 5B)。成管实验: Hypoxia + GLUT1 过表达组分别与 GLUT1 过表达 + Bevacizumab 组 ( $P=0.025\ 9$ )、GLUT1 过表达 + SU5416 组 ( $P=0.003\ 9$ ) 和 GLUT1 过表达 + YC-1 组 ( $P=0.011\ 1$ ) 相比,差异均具有统计学意义(图 5C)。

## 3 讨论

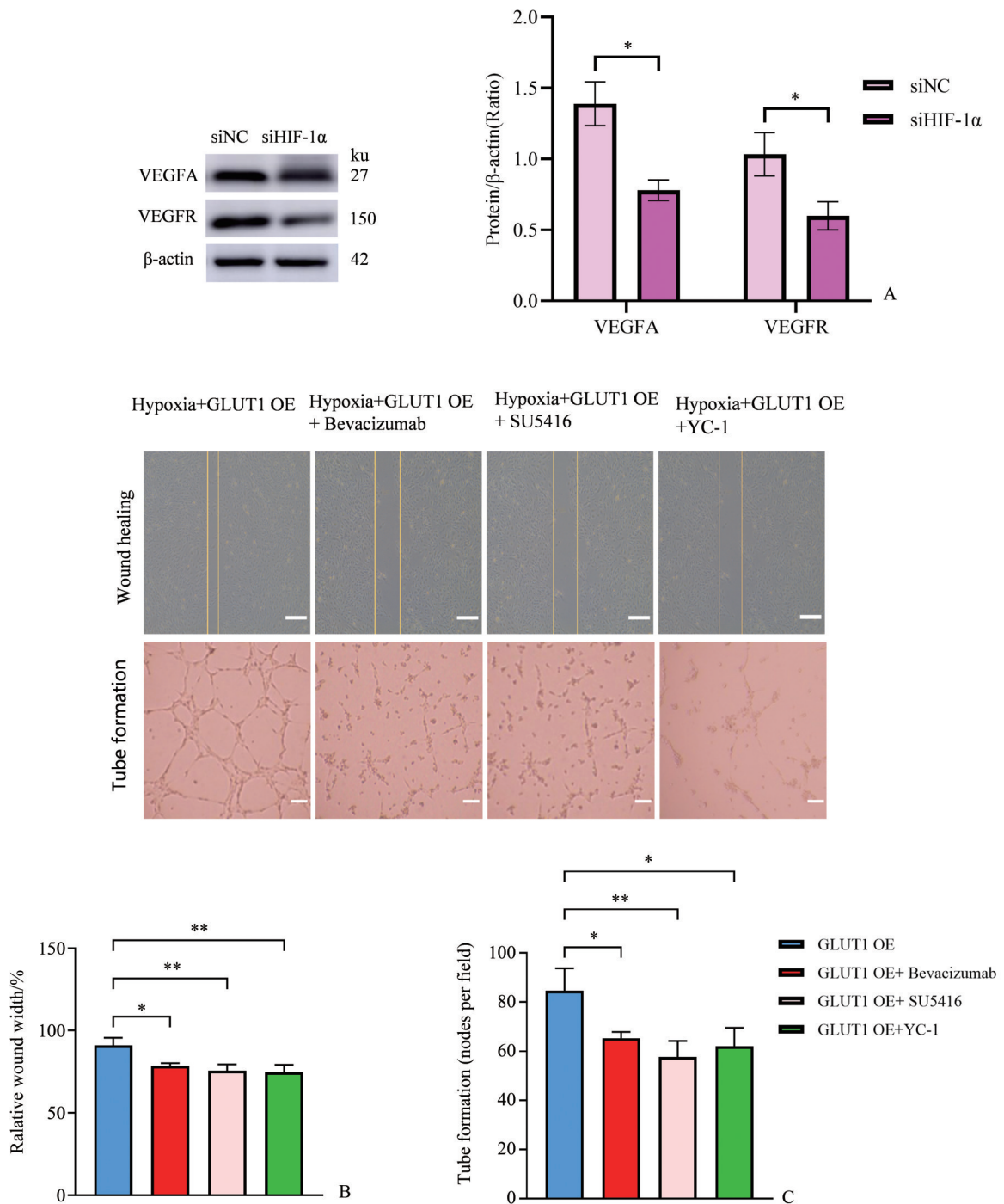
在缺血缺氧环境下,血管新生受阻,这对于了解组织缺氧缺血至关重要。血管新生是一个涉及多种因素的高度有序过程,其中包括内皮细胞的增殖、迁移以及血管形成<sup>[13-16]</sup>。慢性缺血缺氧会导致细胞能量代谢、存活和功能受损,从而加剧组织的



A: Protein expression of GLUT1, HIF-1 $\alpha$ , VEGFA and VEGFR in HUVECs was detected by Western blot assay under normoxic conditions; B: Protein expression of GLUT1, HIF-1 $\alpha$ , VEGFA and VEGFR in HUVECs was detected by Western blot assay under hypoxic conditions. C: Representative morphological changes in human umbilical vein endothelial cells under normoxia or hypoxia, as captured by transmission electron microscopy (white scale bar =1 000 nm). Cells under normoxia show intact mitochondrion, Hypoxic cells show swelling of mitochondria, and GLUT1 OE show small mitochondria; D: Seahorse metabolic analysis of OCRs in the HUVECs; E-G The OCR assay was used to observe the basal, maximal mitochondrial respiratory function and spare respiratory capacity; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Data are shown as mean $\pm$ SD,  $n=3$ .

图 4 刺激 GLUT1 表达后减弱了缺血缺氧对 HUVECs 的抑制作用

Fig. 4 The stimulation of GLUT1 expression mitigates the inhibitory effect of ischemia-hypoxia on HUVECs



A: Protein expression of VEGFA and VEGFR in HUVECs was detected by Western blot assay; B: Under hypoxic conditions the wound healing assay was used to detect the migration activity of HUVECs, and the scale bar is 50  $\mu$ m; C: Tube formation assays were employed to detect the formation of capillary-like tubules by HUVECs after different treatments under hypoxic conditions, and the scale bar is 50  $\mu$ m; \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01. Data are shown as mean $\pm$ SD,  $n$ =3.

图5 GLUT1通过调控HIF-1 $\alpha$ -VEGFA/VEGFR轴增强HUVECs葡萄糖代谢与血管生成功能

Fig. 5 GLUT1 enhances glucose metabolism and angiogenic function of HUVECs by regulating the HIF-1 $\alpha$ -VEGFA/VEGFR axis

血液供应不足<sup>[17]</sup>。在本研究中,我们重点探讨了 GLUT1在缺血缺氧环境下对HUVECs的增殖、迁

移、粘附和血管形成的影响。我们发现,在慢性缺血缺氧条件下, GLUT1的表达下调,并且与

HUVECs的功能变化密切相关。

为验证这一发现,我们首先通过CCK-8实验和细胞增殖实验发现,慢性缺血缺氧对细胞活性和增殖具有抑制作用。进一步的Western blot结果表明,慢性缺血缺氧环境下HIF-1 $\alpha$ 的表达降低,这与HIF-1 $\alpha$ 表达与缺氧暴露的程度和持续时间有关一致。此外,细胞免疫荧光实验结果证实了GLUT1在HUVECs中的表达。

慢性缺血缺氧条件下GLUT1的表达下降,这种差异可能与细胞对缺血缺氧环境的适应性反应有关。在慢性缺血缺氧条件下,HUVECs可能通过降低GLUT1的表达来减少葡萄糖的摄取,以适应能量需求的变化。这种适应性变化可能与心血管疾病的发展有关,进而影响血管形成的进程<sup>[18]</sup>。

我们的细胞功能实验发现,慢性缺血缺氧明显抑制内皮细胞的迁移和管状结构形成能力,然而,当GLUT1高表达后,能有效增加缺血缺氧下内皮细胞的迁移能力。此外,利用基质胶模拟缺血缺氧环境下HUVECs的管状结构形成能力,我们观察到在缺血缺氧条件下,刺激GLUT1过表达的HUVECs更倾向于形成血管结构,显示出成管能力的增强。这些结果表明,在缺血缺氧情况下,GLUT1表达的升高能够逆转HUVECs的细胞迁移和体外管状结构形成能力的抑制。

在正常情况下,HIF-1 $\alpha$ 在氧充足时会被脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain-containing protein, PHD)羟基化,然后被Von Hippel-Lindau蛋白(pVHL)识别并降解。然而,在急性缺血缺氧条件下,PHD的活性受限,导致HIF-1 $\alpha$ 的积累和稳定,进而促进其进入细胞核与HIF-1 $\beta$ 结合,形成HIF-1复合体并与缺氧反应基因上的缺氧反应元件结合,调控一系列基因的表达,包括促红细胞生成素、血管内皮生长因子、糖酵解酶、葡萄糖转运蛋白(GLUT)等<sup>[19-21]</sup>,这些基因在调节细胞供氧和能量代谢、细胞增殖和凋亡及新生血管等方面具有重要作用。然而,在深入探讨研究的过程中,我们发现一个引人注目的现象:在慢性缺血缺氧环境中,HUVECs中HIF-1 $\alpha$ 和VEGFA的水平并没有像预期的那样升高,相反,它们出现了下降,表明这种反馈代偿调节功能在慢性缺血缺氧条件下已经失效。

为了探究这一机制,我们进行了进一步实验,我们通过基因操作手段过表达GLUT1,这是一种葡萄糖转运蛋白,对细胞能量代谢有着重要影响。令人惊讶的是,Western blot结果表明HIF-1 $\alpha$ 和VEGFA的降低被明显抑制,同时伴随VEGFR的增加。此外,通过透射电镜观察到线粒体基质的肿胀程度减轻,出现了更多的小体积线粒体,并且HUVECs氧化磷酸化能力得到了增强。基于这些观察结果,我们推测,GLUT1过表达可能增加HUVECs氧化磷酸化能力,使其获得更多的ATP,从而为细胞提供了充足的能量,恢复了HIF-1 $\alpha$ 对缺血缺氧应激的适应性响应。

进一步分析,我们认为GLUT1可能是通过调控HIF-1 $\alpha$ -VEGFA/VEGFR轴来增强HUVECs葡萄糖代谢与血管生成功能<sup>[22]</sup>。GLUT1作为关键的葡萄糖转运蛋白,其过表达不仅提升了细胞对葡萄糖的摄取,还通过影响HIF-1 $\alpha$ 的稳定性和活性,进而调控VEGFA和VEGFR的表达。HIF-1 $\alpha$ 作为缺氧应答的核心转录因子<sup>[23-26]</sup>,在GLUT1的调节下,与VEGFA/VEGFR协同作用,共同促进了血管生成相关基因的表达和血管生成过程。这一过程中,GLUT1通过调控HIF-1 $\alpha$ -VEGFA/VEGFR轴,将细胞的葡萄糖代谢与血管生成功能紧密联系起来,在缺血缺氧环境下对维持细胞的正常生理功能起到了关键作用。

综上所述,本研究表明,缺血缺氧刺激会促使内皮细胞GLUT1的表达下降,伴随HIF-1 $\alpha$ 和VEGFA表达下降,降低了内皮细胞增殖、迁移以及血管形成的能力。然而,通过增加GLUT1的表达,可以逆转HUVECs缺血缺氧情况下HIF-1 $\alpha$ , VEGF和VEGFR的表达及增强HUVECs氧化磷酸化能力,使细胞获得更多的能量,从而促进内皮细胞发芽和新血管形成过程。这些发现为进一步研究GLUT1在血管疾病中的作用提供了新的视角,并可能为开发新的治疗策略提供潜在的靶点。未来的研究应该探索GLUT1在体内模型中的作用,并研究在不同缺血缺氧条件下的功能。此外,了解GLUT1与其他代谢途径的相互作用也是必要的。

## 参考文献

- [1] Fang Z, Zhao G, Zhao S. GTF2H4 regulates partial EndMT via NF- $\kappa$ B activation through NCOA3 phosphorylation in ischemic diseases[J]. *Innovation (Camb)*, 2024, 5(2): 100565.
- [2] Guo Z, Mo Z. Regulation of endothelial cell differentiation in embryonic vascular development and its therapeutic potential in cardiovascular diseases[J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119406.
- [3] Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Angiogenesis*, 2023, 26(3): 313-347.
- [4] Li X, Sun X, Carmeliet P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(3): 414-433.
- [5] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873-887.
- [6] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [7] Peters K, Kamp G, Berz A. Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of "aerobic glycolysis" and proliferation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24(5-6): 483-492.
- [8] Jongkind JF, Verkerk A, Baggen RG. Glutathione metabolism of human vascular endothelial cells under peroxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 1989, 7(5): 507-512.
- [9] Peng Q, Zeng W. The protective role of endothelial GLUT1 in ischemic stroke[J]. *Brain Behav*, 2024, 14(5): e3536.
- [10] De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 634-647.
- [11] Mamun A, Hayashi H, Yamamura A. Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells [J]. *J Physiol Sci*, 2020, 70(1): 44.
- [12] Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration, [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4): 521-530.
- [13] Eelen G, de Zeeuw P, Simons M. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1231-1244.
- [14] Hoying JB, Utzinger U, Weiss JA. Formation of microvascular networks: role of stromal interactions directing angiogenic growth[J]. *Microcirculation*, 2014, 21(4): 278-289.
- [15] Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 63: 1-19.
- [16] Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101799.
- [17] Falkenberg KD, Rohlenova K, Luo Y. The metabolic engine of endothelial cells[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(10): 937-946.
- [18] Meng Y, Xu X, Luan H, et al. The progress and development of GLUT1 inhibitors targeting cancer energy metabolism [J]. *Future med chemist*, 2019, 11(17): 2333-2352.
- [19] Levy AP, Levy NS, Wegner S. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(22): 13333-13340.
- [20] Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 691-696.
- [21] Sousa Fialho MDL, Abd Jamil AH, Stannard GA. Hypoxia-inducible factor 1 signalling, metabolism and its therapeutic potential in cardiovascular disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 831-843.
- [22] Chen X, Qian W, Zhang Y, et al. Ginsenoside CK cooperates with bone mesenchymal stem cells to enhance angiogenesis post-stroke via GLUT1 and HIF-1alpha/VEGF pathway [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(8): 4321-4335.
- [23] Nguyen DT, Famiglietti JE, Smolchek RA, et al. 3D in vitro platform for cell and explant culture in liquid-like solids [J]. *Cells*, 2022, 11(6):
- [24] Suresh MV, Balijepalli S, Solanki S, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1alpha and Its Role in Lung Injury: Adaptive or Maladaptive [J]. *Inflammation*, 2023, 46(2): 491-508.
- [25] 贾远航,谭小武,陈林,等.血清SUMO特异性蛋白酶1/低氧诱导因子-1 $\alpha$ 通路对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者心血管事件结局的预测价值[J].*实用医学杂志*,2023,39(6):719-723;+729.
- Jia YH, Tan XW, Chen L, et al. Predictive value of SENP-1/HIF-1 $\alpha$  pathway on cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *J Pract Med*, 2023, 39(6): 719-723; +729.
- [26] 陈蕾蕾,景德怀,张曜文,等.缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 在炎症性肠病中的作用机制研究进展[J].*中华炎症肠病杂志(中英文)*,2024,8(2):174-180.
- Chen LL, Jing DH, Zhang YW, et al. Research progress on the mechanism of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in inflammatory bowel disease [J]. *Chin J Inflamm Bowel Dis*, 2024, 8(2): 174-180.

(编辑 孙慧兰)