[文章编号] 1671-587X(2024)04-1026-09 DOI:10.13481/j.1671-587X.202404017

SENP-1/HIF-1α通路对慢性间歇性低氧诱导大鼠血管内皮损伤的影响

贾远航，江义霞，何振华，陈 林，周 芳
（南华大学衡阳医学院附属第二医院呼吸与危重症医学科，湖南 衡阳 421001）

[摘 要] **目的：**探讨小泛素样修饰特异性蛋白酶1（SENP-1）/低氧诱导因子1α（HIF-1α）通路对慢性间歇性低氧（CIH）诱导大鼠血管内皮损伤的影响，阐明其相关作用机制。**方法：**SD大鼠随机分为对照组和CIH组，再将每组分为2、4和6周3个时间点亚组，每亚组8只。CIH组大鼠暴露于CIH舱中进行CIH诱导，制备阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征（OSAHS）模型，对照组大鼠暴露于常氧环境中。于各时间点收集各组大鼠血清和胸主动脉组织。HE染色观察各组大鼠胸主动脉血管损伤情况，采用酶联免疫吸附试验（ELISA）法检测各组大鼠血清中一氧化氮（NO）、内皮素1（ET-1）、血管性血友病因子（vWF）和血栓调节蛋白（TM）水平，Western blotting法检测各组大鼠胸主动脉组织中SENP-1、HIF-1α和血管内皮生长因子A（VEGFA）蛋白表达水平。体外培养大鼠主动脉内皮细胞（rAECs），经SENP-1 shRNA腺病毒（sh-SENP-1）感染构建SENP-1基因低表达的rAECs细胞株，采用CIH诱导建立血管内皮细胞损伤模型，分为CIH组、CIH＋sh-NC组和CIH＋sh-SENP-1组，另设对照组。CCK-8检测各组细胞增殖活性，ELISA法检测各组细胞培养上清中乳酸脱氢酶（LDH）活性及细胞中NO、ET-1、丙二醛（MDA）水平和超氧化物歧化酶（SOD）活性，流式细胞术检测各组细胞凋亡率，Western blotting法检测各组细胞中SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达水平。**结果：**随着CIH诱导时间的延长，与对照组比较，CIH组大鼠胸主动脉内膜逐渐粗糙并明显增厚，血清中NO水平逐渐减低（$P<0.05$），血清中ET-1、vWF和TM水平及胸主动脉组织中SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达水平逐渐升高（$P<0.05$）。与对照组比较，CIH组细胞增殖活性降低（$P<0.05$），细胞培养上清中LDH活性及细胞中ET-1、MDA水平和细胞凋亡率升高（$P<0.05$），细胞中NO水平和SOD活性降低（$P<0.05$），SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与CIH组比较，CIH＋sh-SENP-1组细胞增殖活性升高（$P<0.05$），细胞培养上清中LDH活性及细胞中ET-1、MDA水平和细胞凋亡率降低（$P<0.05$），细胞中NO水平和SOD活性升高（$P<0.05$），SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。**结论：**SENP-1/HIF-α通路在CIH诱导的大鼠胸主动脉损伤组织中高度活化，沉默SENP-1表达可减轻CIH诱导的血管内皮细胞损伤，其作用机制可能与下调SENP-1/HIF-α通路活化水平有关。

[关键词] 慢性间歇性低氧；胸主动脉；小泛素样修饰特异性蛋白酶1；低氧诱导因子1α；血管内皮损伤
[中图分类号] R364.4 [文献标志码] A

[收稿日期] 2023-07-19
[基金项目] 湖南省卫健委科研基金项目（202203024555）
[作者简介] 贾远航（1983－），男，湖南省邵阳市人，主治医师，医学硕士，主要从事阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征发病机制方面的研究。
[通信作者] 周 芳，副主任医师（E-mail：932659965@qq.com）

Effect of SENP-1/HIF-1α pathway on vascular endothelial injury in rats with chronic intermittent hypoxia

JIA Yuanhang, JIANG Yixia, HE Zhenhua, CHEN Lin, ZHOU Fang
(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the effect of the small ubiquitin-like modifier-specific protease 1 (SENP-1)/hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) pathway on chronic intermittent hypoxia (CIH)-induced vascular endothelial injury in the rats, and to clarify the related mechanism. **Methods**: The SD rats were randomly divided into control group and CIH group, and then the rats in each group were further divided into 2, 4, and 6-week subgroups, and there were 8 rats in each subgroup. The rats in CIH group were exposed to CIH in a CIH chamber to induce CIH and create the obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS) models, while the rats in control group were exposed to normoxic conditions. The serum and thoracic aorta tissue of the rats in various groups were collected at each time point. HE staining was used to observe the thoracic aorta vascular injury of the rats in various groups; ELISA method was used to detect the levels of nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), von Willebrand factor (vWF), and thrombomodulin (TM) in serum of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of SENP-1, HIF-1α, and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) proteins in thoracic aorta tissue of the rats in various groups. *In vitro*, the aortic endothelial cells (rAECs) of the rats were cultured and infected with SENP-1 shRNA adenovirus (sh-SENP-1) to construct the cell line with low expression of SENP-1. The CIH was used to induce the vascular endothelial cell injury, and the cells were divided into CIH group, CIH+sh-NC group, and CIH+sh-SENP-1 group; control group was set up separately. CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; ELISA method was used to detect the activities of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant and the levels of NO, ET-1, malondialdehyde (MDA), and activities of superoxide dismutase (SOD) in the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins in the cells in various groups. **Results**: With the extension of CIH induction time, compared with control group, the thoracic aorta endothelium in CIH group gradually became rough and significantly thickened, the level of serum NO of the rats in CIH group was decreased ($P<0.05$), and the levels of serum ET-1, vWF, and TM, and the expression levels of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins in thoracic aorta tissue were increased ($P<0.05$). Compared with control group, the proliferation activity of the cells in CIH group was decreased ($P<0.05$), the LDH activity in the supernatant, the levels of ET-1, MDA, and the apoptotic rate in the cells were increased ($P<0.05$), while the levels of NO and activity of SOD in the cells were decreased ($P<0.05$), and the expression levels of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins in the cells were increased ($P<0.05$). Compared with CIH group, the proliferation activity of cells in CIH+sh-SENP-1 group was increased ($P<0.05$), the activity of LDH in the supernatant, the levels of ET-1, MDA, and the apoptotic rate of the cells were decreased ($P<0.05$), while the level of NO and activity of SOD in the cells were increased ($P<0.05$), and the expression levels of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins were decreased ($P<0.05$). **Conclusion**: The SENP-1/HIF-1α pathway is highly activated in the thoracic aorta injury tissue of the rats induced by CIH. Silencing SENP-1 expression can reduce CIH-induced vascular endothelial cell injury, and its mechanism may be related to downregulating the activation level of SENP-1/HIF-1α pathway.

KEYWORDS Chronic intermittent hypoxia; Thoracic aorta; Small ubiquitin-like modified specific protease 1; Hypoxic inducible factor 1α; Vascular endothelial injury

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征（obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome，OSAHS）是一类睡眠时出现呼吸暂停或低通气，引起机体慢性间歇性低氧（chronic intermittent hypoxia，CIH）进而导致睡眠结构紊乱的疾病，常诱发血管内皮损伤[1]。OSAHS是高血压、脑卒中和冠心病等心脑血管疾病的独立危险因素，OASHS患者血管内皮损伤引起的内皮功能障碍与心脑血管疾病的发病有密切关联[2]，但其作用机制尚不明确且缺乏有效的治疗措施。CIH是OSAHS的主要病理生理机制，其引起的氧化应激和炎症是内皮损伤的主要危险因素[3]。相关文献[4]报道：CIH可激活低氧诱导因子1α（hypoxic inducible factor-1α，HIF-1α），加重主动脉内皮细胞的凋亡和损伤。小泛素样修饰（small ubiquitin-like modifier，SUMO）是一种翻译后修饰，HIF-1α被SUMO化修饰后活性将受到抑制，而SUMO特异性蛋白酶1（SUMO specific protease-1，SENP-1）能够通过去SUMO化增强HIF-1α的稳定性[5]。SENP-1/HIF-1α信号通路在大鼠肺动脉平滑肌细胞低氧性增殖[5]和人牙髓干细胞的血管生成中起重要作用[6]。关于SENP-1/HIF-1α信号通路在OSAHS血管内皮损伤中的研究国内外尚未见报道。本研究通过动物实验和细胞实验探讨SENP-1/HIF-1α信号通路在OSAHS血管内皮损伤的作用，为其临床应用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠48只，雄性，鼠龄8周，体质量250～300 g，由武汉云克隆动物有限公司提供，动物使用许可证号：SYXK（鄂）2018-0069。于饲养室温度（23±1）℃、湿度50%～55 %和明暗光照各12 h条件下适应性饲养1周。

1.2 主要试剂和仪器 大鼠主动脉内皮细胞（rat aortic endothelial cells，rAECs）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SENP-1短发夹RNA（short hairpin RNA，shRNA）腺病毒（pShuttle-CMV-sh-SENP-1，sh-SENP-1）及其阴性对照腺病毒（pShuttle-CMV-sh-NC，sh-NC）由汉恒生物技术（上海）有限公司提供，其腺病毒滴度均为1×10^{12} PFU·mL^{-1}。胎牛血清、DMEM培养基和胰蛋白酶购自美国Gibco公司，一氧化氮（nitric oxide，NO）含量检测试剂盒（微量法）、大鼠内皮素1（endothelin-1，ET-1）酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测试剂盒、大鼠血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）ELISA检测试剂盒、大鼠血栓调节蛋白（thrombomodulin，TM）ELISA检测试剂盒、大鼠乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）ELISA检测试剂盒、细胞丙二醛（malondialdehyde，MDA）检测试剂盒（微板法）和超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒（NBT法）购自上海酶联生物科技有限公司，SENP-1抗体、血管内皮生长因子A（vascular endothelial growth factor A，VEGFA）抗体和GAPDH抗体购自英国Abcam公司，HIF-1α抗体购自美国R&D Systems公司，CCK-8试剂盒、First Strand cDNA Synthesis Kit购自武汉塞维尔生物科技有限公司，实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒购自日本TaKaRa公司。S1008间歇氧浓度控制系统和1100-S7型暴露舱购自上海玉研科学仪器有限公司，RT-6100酶标仪购自美国Rayto公司，CFX Connct荧光定量PCR仪购自美国Bio-rad公司，C2激光共聚焦显微镜和E100显微镜购自日本Nikon公司，CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司，Heracell™ Vios 250i CO_2培养箱购自美国Thermo Fisher公司，BV-2垂直电泳仪购自武汉塞维尔生物科技有限公司，MouseOx无创脉搏血氧仪购自美国STARR Life Sciences公司。

1.3 OSAHS大鼠模型制备 48只SD大鼠随机分为对照组和CIH组，再将每组大鼠分为2、4和6周3个时间点亚组，每亚组8只。按照参考文献［7］中的方法，将CIH组大鼠放入间歇性低氧舱中，关闭舱门，向舱内充入氮气和氧气，缓冲4 min，使舱内氧浓度达到8.5%，维持1 min；随后2 min调节舱内空气，使舱内恢复正常空气（氧浓度恢复至21%）并维持1 min，每次循环8 min，每天持续8 h。对照组大鼠置于常氧暴露舱中，常规饲养。分别于CIH诱导2、4和6周时，采用3%戊巴比妥

钠过量麻醉处死各组大鼠，收集外周血和胸主动脉组织，按照实验要求进行保存。

1.4 HE染色观察各组大鼠胸主动脉组织病理形态表现 取出已固定24 h的大鼠胸主动脉组织，乙醇脱水，石蜡包埋，切片；石蜡切片（4 μm）进行梯度乙醇脱蜡至水后，行HE染色，脱水封片，于显微镜下观察大鼠胸主动脉组织病理形态表现。

1.5 细胞培养和腺病毒感染 将rAECs培养于DMEM培养基中，培养箱条件为37 ℃和5 %CO_2。当细胞密度达到90 %时进行传代，取第2代对数生长期rAECs以每孔1×10^5个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中，加入感染复数为100的sh-NC和sh-SENP-1腺病毒载体进行腺病毒感染，将细胞分为sh-NC组和sh-SENP-1组，另设不进行处理的rAECs为空白组。孵育30 min后更换培养基，继续培养24 h。采用RT-qPCR法和Western blotting法检测病毒感染后rAECs中SENP-1 mRNA和蛋白表达水平，验证感染效率。

1.6 血管内皮细胞损伤模型制备及分组 取对数生长期rAECs，采用CIH诱导建立血管内皮细胞损伤模型[8]。调整细胞培养箱O_2浓度，CIH条件：20% O_2培养15 min，1 % O_2培养5 min为1个循环，每小时3个循环，培养24 h。将rAECs分为对照组（未经任何处理）、CIH组（CIH诱导24 h）、CIH+sh-NC组（感染sh-NC腺病毒后CIH诱导24 h）和CIH+sh-SENP-1组（感染sh-SENP-1腺病毒后CIH诱导24 h）。

1.7 RT-qPCR法检测各组细胞中SENP-1 mRNA表达水平 收集各组细胞沉淀，提取总RNA，通过逆转录反应体系生成cDNA，逆转录程序：25 ℃、5 min，42 ℃、30 min，85 ℃、5 s。以cDNA为模板，GAPDH为内参，进行PCR扩增，扩增参数如下：95 ℃、30 s；95 ℃、15 s，60 ℃、30 s，40个循环；65 ℃→95 ℃，每升温0.5 ℃，采集一次荧光信号。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算各组细胞中SENP-1 mRNA表达水平。引物序列：SENP-1，F 5′-CCAGCATTTTAACTAACCAGGAAC-3′，R 5′-GCTAAGTTATCTGGCTGATGTGG-3′；GAPDH，F 5′-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3′，R 5′-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3′。

1.8 CCK-8法检测各组细胞增殖活性 取各组rAECs，按照每孔1×10^3个细胞的密度接种至96孔细胞培养板中，同时设置空白孔，每组3个复孔，在37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养至70%融合时进行CIH诱导24 h。提前4 h向每孔中加入10 μL CCK-8溶液，孵育4 h后，用酶标仪检测450 nm波长处吸光度（A）值。细胞增殖活性=（实验组A值－空白孔A值）/（对照组A值－空白孔A值）×100%。

1.9 ELISA法检测各组大鼠血清中NO、ET-1、vWF、TM水平及细胞培养上清中LDH活性和细胞中NO、ET-1、MDA水平及SOD活性 取各组大鼠血清、细胞培养上清并收集各组细胞样本，按照ELISA试剂盒说明书进行操作，采用酶标仪测定各孔A值，根据标准曲线计算各组大鼠血清中NO、ET-1、vWF和TM水平，细胞培养上清中LDH活性，细胞中NO、ET-1、MDA水平和SOD活性。

1.10 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 分组处理后收集各组细胞，重悬细胞并调整细胞密度为$2\times10^4 mL^{-1}$，取500 μL重悬细胞，加入195 μL Annexin Ⅴ-FITC结合液，再依次加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和10 μL碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色液轻轻混匀，室温避光孵育10 min，上机检测。在散点图上，Q2-1象限为机械性损伤的细胞，Q2-2象限为晚期凋亡或者坏死细胞，Q2-3象限为正常细胞，Q2-4象限为早期凋亡细胞。细胞凋亡率（%）=Q2-2象限细胞百分率+Q2-4象限细胞百分率。

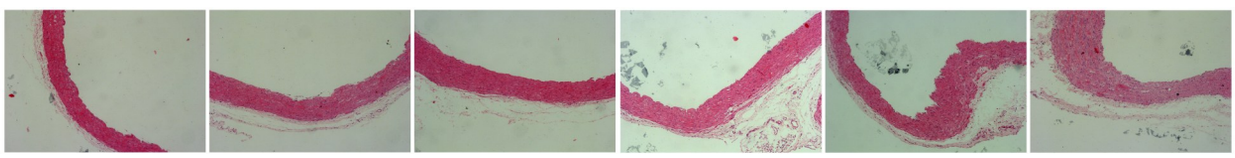
1.11 Western blotting法检测各组大鼠胸主动脉组织和细胞中SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达水平 收集各组大鼠胸主动脉组织和各组细胞沉淀，提取总蛋白，进行蛋白浓度测定。上样已沸水浴变性的蛋白，经聚丙烯氨酰胺凝胶电泳，转PVDF膜，5%脱脂牛奶封闭，分别加入一抗SENP-1抗体（1∶1 000）、HIF-1α抗体（1∶1 000）、VEGFA抗体（1∶1 000）和GAPDH抗体（1∶1 000）稀释缓冲液孵育，加入辣酸根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记IgG二抗（1∶10 000）再次孵育，洗涤，进行化学发光。采用Alpha灰度分析软件分析目的蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.12 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。各组大鼠血清中NO、ET-1、vWF和TM水平及胸主动脉组织中SENP-1、HIF-1α和

VEGFA 蛋白表达水平，各组细胞增殖活性，各组细胞培养上清中 LDH 活性，各组细胞中 NO、ET-1、MDA 水平和 SOD 活性，各组细胞凋亡率，各组细胞中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平，均符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间样本均数比较采用独立样本 t 检验，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　各组大鼠胸主动脉组织病理形态表现　CIH 诱导 2、4 和 6 周时，对照组大鼠胸主动脉组织形态结构完整，管壁无增厚，内皮光滑，无剥脱和缺失；与对照组比较，CIH 组大鼠胸主动脉组织内皮粗糙，内皮细胞排列无序，管壁明显增厚，且随着 CIH 诱导时间的延长，CIH 组大鼠胸主动脉组织损伤逐渐加重。见图 1。



A－C：Control group；D－F：CIH group；A，D：2 weeks；B，E：4 weeks；C，F：6 weeks.

图 1　不同时间点各组大鼠胸主动脉组织病理形态表现（HE，×200）

Fig. 1　Morphology of thoracic aortic tissue of rats in various groups at different time points(HE，×200)

2.2　各组大鼠血清中 NO、ET-1、vWF 和 TM 水平　CIH 诱导 2 周时，与对照组比较，CIH 组大鼠血清中 NO、ET-1、vWF 和 TM 水平差异无统计学意义（$P>0.05$）；CIH 诱导 4 和 6 周时，与同时间点对照组和 CIH 组 2 周时比较，CIH 组大鼠血清中 NO 水平降低（$P<0.05$），而 ET-1、vWF 和 TM 水平升高（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　各组大鼠血清中 NO、ET-1、vWF 和 TM 水平

Tab. 1　Levels of NO，ET-1，vWF，and TM in serum of rats in various groups　（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

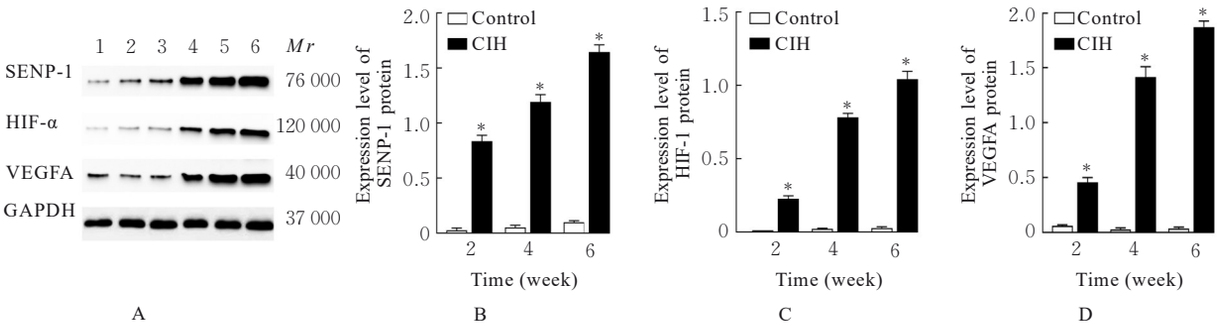
Group	NO [c_B/(μmol·L^{-1})]	ET-1 [ρ_B/(mg·L^{-1})]	vWF [ρ_B/(μg·L^{-1})]	TM [ρ_B/(μg·L^{-1})]
Control				
2 weeks	37.52±4.23	73.75±6.49	1.72±0.28	0.87±0.22
4 weeks	39.12±4.20	72.95±3.38	1.74±0.31	0.85±0.17
6 weeks	37.65±4.49	70.31±3.30	1.72±0.37	0.88±0.19
CIH				
2 weeks	35.03±4.72	76.50±6.29	1.81±0.37	0.92±0.18
4 weeks	27.53±6.60$^{*\triangle}$	119.46±10.84$^{*\triangle}$	3.36±0.50$^{*\triangle}$	2.08±0.34$^{*\triangle}$
6 weeks	16.23±5.13$^{*\triangle}$	198.63±13.69$^{*\triangle}$	6.68±0.83$^{*\triangle}$	4.45±0.70$^{*\triangle}$

$^{*}P<0.05$ compared with 2 weeks in CIH group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with control group at same time.

2.3　各组大鼠胸主动脉组织中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平　CIH 诱导 2、4 和 6 周时，对照组大鼠胸主动脉组织中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）；与对照组比较，随 CIH 诱导时间的延长，CIH 组大鼠胸主动脉组织中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平逐渐升高（$P<0.05$）。见图 2。

2.4　SENP-1 感染效率和各组细胞增殖活性　与空白组和 sh-NC 组比较，sh-SENP-1 组细胞中 SENP-1 mRNA 和蛋白表达水平降低（$P<0.05$）（图 3A～3C）。CCK-8 法检测，与对照组比较，CIH 组细胞增殖活性降低（$P<0.05$）；与 CIH 组比较，CIH＋sh-SENP-1 组细胞增殖活性升高（$P<0.05$），CIH＋sh-NC 组细胞增殖活性差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 3D）。

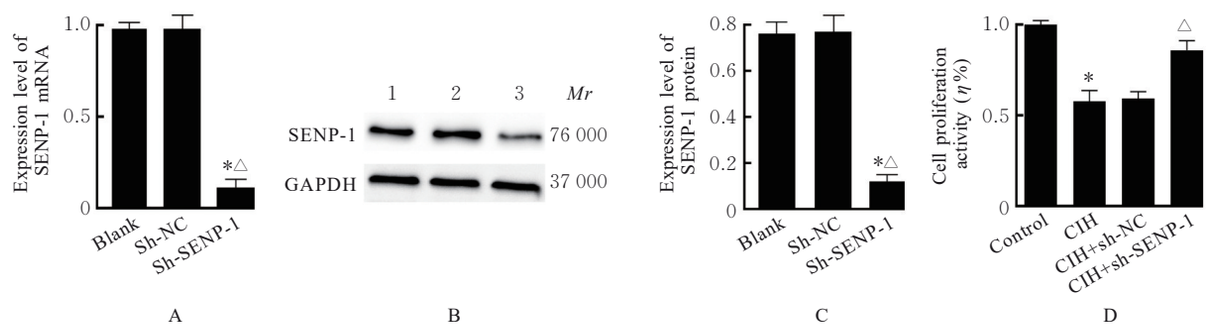
2.5　各组细胞培养上清中 LDH 活性及细胞中 NO、ET-1、MDA 水平和 SOD 活性　与对照组比较，CIH 组细胞培养上清中 LDH 活性及细胞中 ET-1 和 MDA 水平升高（$P<0.05$），细胞中



Lane 1－3：Control group；Lane 4－6：CIH group；Lane 1，4：2 weeks；Lane 2，5：4 weeks；Lane 3，6：6 weeks. $^{*}P<0.05$ compared with control group.

图2 不同时间点各组大鼠胸主动脉组织中SENP-1、HIF-1α和VEGFA蛋白表达电泳图(A)及直条图(B～D)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histograms (B－D) of expressions of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins in thoracic aorta tissue of rats in various groups at different time points



A：Expression levels of SENP-1 mRNA in various groups ($^{*}P<0.05$ compared with blank group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with sh-NC group)；B：Electrophoregram of expressions of SENP-1 protein in various groups；C：Expression levels of SENP-1 protein in various groups ($^{*}P<0.05$ compared with blank group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with sh-NC group)；D：Cell proliferation activities in various groups ($^{*}P<0.05$ compared with control group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with CIH group).

图3 SENP-1感染效率和各组细胞增殖活性

Fig. 3 Infection efficiencies of SENP-1 and proliferation activities of cells in various groups

NO水平和SOD活性降低（$P<0.05$）；与CIH组比较，CIH＋sh-SENP-1组细胞培养上清中LDH活性及细胞中ET-1和MDA水平降低（$P<0.05$），细胞中NO水平和SOD活性升高（$P<0.05$），CIH＋sh-NC组细胞中上述各指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表2。

2.6 各组细胞凋亡率 与对照组（7.30%±0.98%）比较，CIH组细胞凋亡率（39.21%±4.94%）升高（$P<0.05$）；与CIH组比较，CIH＋sh-SENP-1组细胞凋亡率（21.62%±3.53%）降

表2 各组细胞培养上清中LDH活性及细胞中NO、ET-1、MDA水平和SOD活性

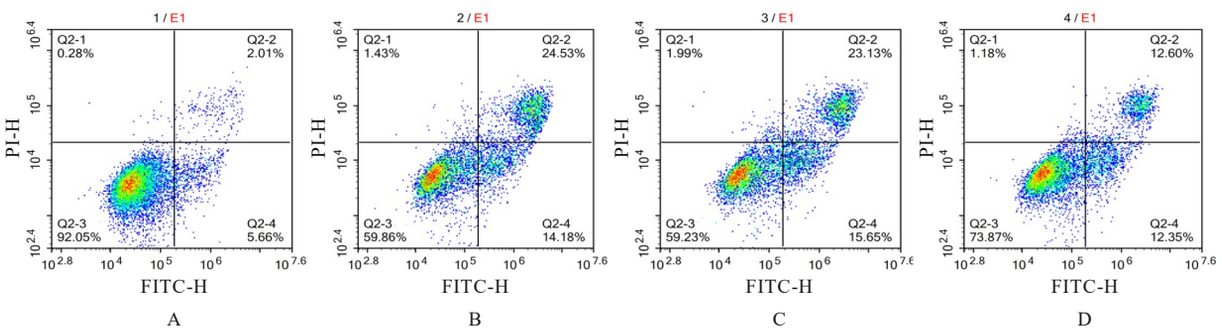
Tab. 2 Activities of LDH in cell culture supernatant and levels of NO, ET-1, MDA and activity of SOD in cells in various groups ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	LDH[λ_B/(U·L^{-1})]	NO [c_B/(μmol·L^{-1})]	ET-1 [ρ_B/ (μg·L^{-1})]	MDA[c_B/(μmol·L^{-1})]	SOD[λ_B/(U·L^{-1})]
Control	600.53±48.12	41.52±6.33	499.33±60.05	1.28±0.22	17.44±1.57
CIH	1 120.85±58.08*	23.18±3.86*	940.50±100.27*	4.64±0.37*	9.49±0.82*
CIH＋sh-NC	1 117.63±39.72	24.55±4.01	931.68±71.65	4.53±0.41	9.46±0.79
CIH＋sh-SENP-1	758.46±45.05$^{\triangle}$	37.46±4.81$^{\triangle}$	646.74±70.50$^{\triangle}$	2.27±0.34$^{\triangle}$	14.66±1.49$^{\triangle}$

$^{*}P<0.05$ compared with control group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with CIH group.

低（$P<0.05$），CIH＋sh-NC 组细胞凋亡率（37.60%±3.92%）差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 4。

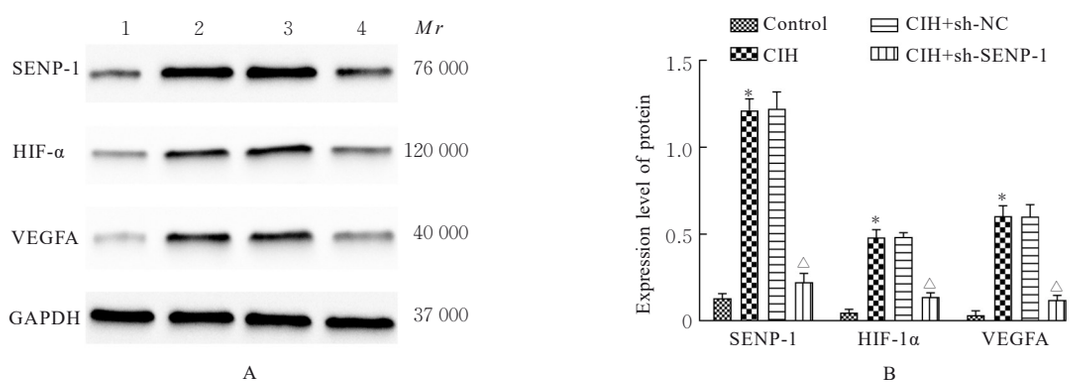
2.7　各组细胞中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平　与对照组比较，CIH 组细胞中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 CIH 组比较，CIH＋sh-SENP-1 组细胞中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），CIH＋sh-NC 组细胞中上述各指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 5。



A: Control group; B: CIH group; C: CIH＋sh-NC group; D: CIH＋sh-SENP-1 group.

图 4　流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig. 4　Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry



Lane 1: Control group; Lane 2: CIH group; Lane 3: CIH＋sh-NC group; Lane 4: CIH＋sh-SENP-1 group. *$P<0.05$ compared with control group; △$P<0.05$ compared with CIH group.

图 5　Western blotting 法检测各组细胞中 SENP-1、HIF-1α 和 VEGFA 蛋白表达电泳图（A）及直条图（B）

Fig. 5　Electrophoregram (A) and histogram(B) of expressions of SENP-1, HIF-1α, and VEGFA proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

3　讨　论

近年来，OSAHS 引起的心血管疾病逐年上升，已成为国内外公共健康问题[9]。OSAHS 引起的 CIH 可造成血流动力学改变，引起血管损伤，是导致心血管疾病的独立危险因素[10]。本研究采用 CIH 诱导法成功构建 OSAHS 大鼠模型。NO、ET-1、vWF 和 TM 是血管内皮细胞损伤标志物，本研究结果显示：随着 CIH 诱导时间的延长，OSAHS 大鼠血清中 NO 水平持续降低，ET-1、vWF 和 TM 水平持续升高，且组织病理染色结果显示大鼠胸主动脉内皮损伤加重，提示 CIH 可造成 OSAHS 大鼠的血管内皮损伤，与王海娟等[11]研究结果一致。

CIH 可模拟睡眠中缺氧-复氧合过程，极大程度还原 OSAHS 的发病过程。研究[12-16]显示：OSAHS 的发病机制与氧化应激通路激活和炎症反应有关。在间歇低氧激活的氧化应激及炎症通路中，HIF-1α 依赖的适应性通路可被间歇低氧诱导[17-19]，在 OSAHS 的发生发展过程中起重要作用。HIF-1α 是参与机体低氧相关性基因表达调控的重要转录因子。研究[20-21]显示：SENP-1 可影响 HIF-1α 信号通路的活性，并参与 HIF-1α 所介导的生理病理过程，具有正反馈作用。在低氧时，SENP-1

被激活，SENP-1基因的启动子上2个缺氧反应元件（hypoxia response element，HRE）与HIF-1α结合，进而促进SENP-1基因的录。转录后的SENP-1对低氧诱导的SUMO化HIF-1α进行去SUMO化，从而使HIF-1α稳定表达，发生核转位，转录激活，调节多种靶基因，如血管内皮损伤标志物VEGF和促红细胞生成素等，基因产物在细胞增殖、细胞分化和新生血管生成等方面发挥重要作用[22]。本研究结果显示：CIH可诱导OSAHS大鼠胸主动脉组织和rAECs中SENP-1、HIF-1α及VEGFA蛋白表达升高；同时CIH还可提高rAECs凋亡率、LDH活性及ET-1和MDA水平，降低大鼠血清中NO水平和SOD活性，并抑制rAECs增殖活性，推测CIH引起的血管内皮损伤可高度活化SENP-1/HIF-α信号通路并提高氧化应激和细胞凋亡水平。为了进一步研究SENP-1/HIF-α信号通路对血管内皮损伤的影响，本研究采用sh-SENP-1腺病毒感染CIH诱导下的rAECs，通过沉默SENP-1表达抑制HIF-α蛋白SUMO化降解，结果显示：SENP-1基因沉默可降低CIH诱导的细胞凋亡和氧化应激水平，提高rAECs增殖活性，说明抑制SENP-1/HIF-α通路活化对OSAHS引起的血管内皮损伤中氧化应激和细胞凋亡具有减轻作用。

综上所述，SENP-1/HIF-α通路在CIH诱导的大鼠胸主动脉损伤组织中高度活化，沉默SENP-1表达可减轻CIH诱导的大鼠主动脉血管内皮细胞损伤，其作用机制可能与下调SENP-1/HIF-α通路活化有关。针对目前国内外相关研究存在的不足，本研究从动物和细胞水平研究SENP-1/HIF-1α信号通路在OSAHS引起的血管内皮损伤中的作用，为后期将SENP-1/HIF-1α信号通路作为心血管疾病的治疗靶点提供理论依据。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

贾远航参与实验过程和论文撰写，江义霞参与实验数据收集和整理，何振华参与统计学分析和论文修改，陈林参与论文初稿审校和数据核查，周芳参与实验方案设计和论文审校。

[参考文献]

[1] DAULATZAI M A. Role of sensory stimulation in amelioration of obstructive sleep apnea [J]. Sleep Disord, 2011, 2011: 596879.

[2] LUI M M S, LAM D C L, IP M S M. Significance of endothelial dysfunction in sleep-related breathing disorder[J]. Respirology, 2013, 18(1): 39-46.

[3] YAN Y R, ZHANG L, LIN Y N, et al. Chronic intermittent hypoxia-induced mitochondrial dysfunction mediates endothelial injury via the TXNIP/NLRP3/IL-1β signaling pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 401-410.

[4] DING H B, HUANG J F, WU D W, et al. Silencing of the long non-coding RNA MEG3 suppresses the apoptosis of aortic endothelial cells in mice with chronic intermittent hypoxia via downregulation of HIF-1α by competitively binding to microRNA-135a [J]. J Thorac Dis, 2020, 12(5): 1903-1916.

[5] ZHOU F, DAI A G, JIANG Y L, et al. SENP-1 enhances hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells by regulating hypoxia-inducible factor-1α[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3482-3490.

[6] ZHOU J, SUN C. SENP1/HIF-1α axis works in angiogenesis of human dental pulp stem cells [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(3): e22436.

[7] 温 雯，姚巧玲，陈玉岚，等. 瞬时受体电位通道C与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征大鼠心脏和肾脏损害的关系[J]. 浙江大学学报(医学版)，2020，49(4)：439-446.

[8] ZHAO F, MENG Y, WANG Y, et al. Protective effect of Astragaloside Ⅳ on chronic intermittent hypoxia-induced vascular endothelial dysfunction through the calpain-1/SIRT1/AMPK signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 920977.

[9] REDLINE S, AZARBARZIN A, PEKER Y. Obstructive sleep apnoea heterogeneity and cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(8): 560-573.

[10] 雷培良，李 兵. CPAP治疗对OSAHS患者心血管系统并发症的影响[J]. 激光杂志，2010，31(1)：91，93.

[11] 王海娟，张晓雪，韩玉洁，等. 邢氏夏枯草汤对慢性间歇性低氧高血压大鼠血管内皮损伤的保护作用及其机制[J]. 中药药理与临床，2022，38(3)：43-48.

[12] STANEK A, BROŻYNA-TKACZYK K, MYŚLIŃSKI W. Oxidative stress markers among obstructive sleep apnea patients [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9681595.

[13] MELIANTE P G, ZOCCALI F, CASCONE F, et al. Molecular pathology, oxidative stress, and biomarkers in obstructive sleep apnea[J]. Int J Mol Sci, 2023,

24(6)：5478.

[14] MANIACI A，IANNELLA G，COCUZZA S，et al. Oxidative stress and inflammation biomarker expression in obstructive sleep apnea patients[J]. J Clin Med，2021，10(2)：277.

[15] YANG C L，ZHOU Y Q，LIU H J，et al. The role of inflammation in cognitive impairment of obstructive sleep apnea syndrome[J]. Brain Sci，2022，12(10)：1303.

[16] 黄家容，张凤蕊，平 芬. miRNA在阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志，2023，48(6)：735-741.

[17] ARNAUD C，BOCHATON T，PÉPIN J L，et al. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences：Pathophysiological mechanisms[J]. Arch Cardiovasc Dis，2020，113(5)：350-358.

[18] SEMENZA G L. Expression of hypoxia-inducible factor 1：mechanisms and consequences[J]. Biochem Pharmacol，2000，59(1)：47-53.

[19] MARTINEZ C A，JIRAMONGKOL Y，BAL N，et al. Intermittent hypoxia enhances the expression of hypoxia inducible factor HIF1A through histone demethylation[J]. J Biol Chem，2022，298(11)：102536.

[20] CHENG J K，KANG X L，ZHANG S，et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia[J]. Cell，2007，131(3)：584-595.

[21] HSU H L，LIAO P L，CHENG Y W，et al. Chloramphenicol induces autophagy and inhibits the hypoxia inducible factor-1 alpha pathway in non-small cell lung cancer cells[J]. Int J Mol Sci，2019，20(1)：157.

[22] XU Y，ZUO Y，ZHANG H Z，et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis[J]. J Biol Chem，2010，285(47)：36682-36688.