

研究论文

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

程缘^{1, #}, 田云娜^{1, #}, 黄曼¹, 徐俊鹏¹, 曹文傑¹, 贾旭广², 尤利益^{3, *}, 王万铁^{1, *}

¹温州医科大学缺血/再灌注损伤研究所, 温州 325035; ²宜宾学院体育与大健康学院, 宜宾 644000; ³温州医科大学温州市第三临床学院超声科, 温州 325400

摘要: 本文旨在探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是否通过抑制有氧糖酵解-细胞焦亡而改善大鼠低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)。雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠随机分为正常对照组、正常+ NaHS组、低氧组和低氧+ NaHS组, 每组各6只。正常对照组大鼠置于常氧(21% O₂)环境中, 每天腹腔注射等体积生理盐水; 正常+NaHS组大鼠置于常氧环境中, 每天腹腔注射 14 μmol/kg NaHS; 低氧组大鼠置于缺氧箱中, 箱内氧气控制器通过控制N₂流速使氧浓度维持在9%~10%, 大鼠每天腹腔注射等体积生理盐水; 低氧+NaHS组大鼠同样置于缺氧箱中, 每天腹腔注射 14 μmol/kg NaHS。四周造模结束后, 用右心导管插管技术检测各组大鼠的平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP), 称重并计算右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI), 用HE染色观察肺组织病理改变程度, 用Masson染色观察肺组织纤维化情况, 用Western blot检测肺组织己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)、丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、GSDMD蛋白N-端片段(GSDMD-N-terminal domain, GSDMD-N)、Caspase-1、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)和IL-18蛋白表达水平, 用ELISA检测肺组织IL-1β和IL-18含量。结果显示, 与正常对照组相比, 正常+NaHS组各项指标无明显变化, 而低氧组mPAP和RVHI显著上升, 肺血管壁明显增厚、管腔狭窄, 胶原纤维增多, 肺组织有氧糖酵解相关蛋白HK2、PKM2蛋白表达显著上调, 细胞焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-1β、IL-18蛋白表达显著上调, IL-1β、IL-18含量增多; 低氧组的上述指标的变化均被NaHS显著逆转。上述结果提示, H₂S可通过抑制有氧糖酵解-细胞焦亡改善大鼠HPH。

关键词: 硫化氢; 肺动脉高压; 糖酵解; 细胞焦亡; 低氧

Hydrogen sulfide ameliorates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting aerobic glycolysis-pyroptosis

CHENG Yuan^{1, #}, TIAN Yun-Na^{1, #}, HUANG Man¹, XU Jun-Peng¹, CAO Wen-Jie¹, JIA Xu-Guang², YOU Li-Yi^{3, *}, WANG Wan-Tie^{1, *}

¹Institute of Ischemia/Reperfusion Injury, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²College of Physical Education and Health, Yibin University, Yibin 644000, China; ³Department of Ultrasound, Wenzhou Third Clinical Institute Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou 325400, China

Abstract: The present study aimed to explore whether hydrogen sulfide (H₂S) improved hypoxic pulmonary hypertension (HPH) in rats by inhibiting aerobic glycolysis-pyroptosis. Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group, normal+NaHS group, hypoxia group, and hypoxia+NaHS group, with 6 rats in each group. The control group rats were placed in a normoxic (21% O₂) environment and received daily intraperitoneal injections of an equal volume of normal saline. The normal+NaHS group

This work was supported by the Scientific Research Cultivation Program of Yibin University (No. 2022PY24).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. YOU Li-Yi: Tel: +86-577-88059878; E-mail: youliyi@sohu.com; WANG Wan-Tie: Tel: +86-577-86689817; E-mail: wwt@wmu.edu.cn

rats were placed in a normoxic environment and intraperitoneally injected with 14 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS daily. The hypoxia group rats were placed in a hypoxia chamber, and the oxygen controller inside the chamber maintained the oxygen concentration at 9% to 10% by controlling the N_2 flow rate. An equal volume of normal saline was injected intraperitoneally every day. The hypoxia+NaHS group rats were also placed in an hypoxia chamber and intraperitoneally injected with 14 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS daily. After the completion of the four-week modeling, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) of each group was measured using right heart catheterization technique, and the right ventricular hypertrophy index (RVHI) was weighed and calculated. HE staining was used to observe pathological changes in lung tissue, Masson staining was used to observe fibrosis of lung tissue, and Western blot was used to detect protein expression levels of hexokinase 2 (HK2), pyruvate dehydrogenase (PDH), pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), GSDMD-N-terminal domain (GSDMD-N), Caspase-1, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 in lung tissue. ELISA was used to detect contents of IL-1 β and IL-18 in lung tissue. The results showed that, compared with the normal control group, there were no significant changes in all indexes in the normal+NaHS group, while the hypoxia group exhibited significantly increased mPAP and RVHI, thickened pulmonary vascular wall, narrowed lumen, increased collagen fibers, up-regulated expression levels of aerobic glycolysis-related proteins (HK2 and PKM2), up-regulated expression levels of pyroptosis-related proteins (NLRP3, GSDMD-N, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18), and increased contents of IL-1 β and IL-18. These changes of the above indexes in the hypoxia group were significantly reversed by NaHS. These results suggest that H_2S can improve rat HPH by inhibiting aerobic glycolysis-pyroptosis.

Key words: hydrogen sulfide; pulmonary hypertension; glycolysis; pyroptosis; hypoxia

肺动脉高压是一种由多种已知或未知因素引起的疾病, 并且预后严重, 其特征为进行性肺血管重塑、肺血管阻力和肺动脉压升高, 如果不加干预最终会导致右心室衰竭和死亡。现有的治疗方法不能逆转这种疾病, 发病率和死亡率持续处于较高水平^[1]。

细胞焦亡(pyroptosis)是由核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 启动后激活 Caspase-1/4/5/11 的一种新的促炎症程序性细胞死亡方式^[2]。近年来, 细胞焦亡在肺动脉高压的重要作用备受关注, 且现有研究充分证明了细胞焦亡参与肺动脉高压病理生理学进程^[3-5]。据此, 本研究以细胞焦亡为突破口, 探讨抑制细胞焦亡能否减轻肺动脉高压时炎症反应, 以期对肺动脉高压的防治提供新思路。

有氧糖酵解(aerobic glycolysis)是一个复杂的过程, 即葡萄糖在有氧情况下通过多种酶的催化代谢, 最终的产物是乳酸。研究表明, 有氧糖酵解可激活炎性小体^[1, 6], 还可激活免疫细胞^[7], 具有促炎作用。此外, 有氧糖酵解的终产物乳酸可促进炎症因子的释放, 抑制 Caspase-1 可逆转乳酸的这一效应^[8], 提示糖酵解和细胞焦亡之间存在某种联系。更重要的是, 在肺动脉高压模型中, 糖酵解程度增加, 而抑制糖酵解可减轻肺部炎症反应, 从而改善肺动脉高压^[9]。以上研究提示, 有氧糖酵解可能成为防治肺动脉高压的潜在重要靶点。

硫化氢(H_2S)一种气体信号分子, 广泛参与人体内各种系统的调节^[10]。但 H_2S 是一种有毒气体, 对人类的致死浓度为 500~1000 ppm, 长时间接触 H_2S 会造成眼睛、大脑等多种器官及呼吸系统损伤^[11]。近年来, H_2S 在肺动脉高压中的作用备受学者们的关注。Zhang 等研究显示, 内源性 H_2S 可以抑制核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 通路激活, 从而抑制肺动脉高压中的肺动脉内皮细胞炎症^[12]。另有研究显示, 补充外源性的 H_2S 可减轻肺动脉高压, 如降低肺动脉压、减轻血管重塑和肺炎症反应^[13]。此外, H_2S 可通过抑制细胞凋亡、氧化应激、炎症反应、内皮间质转化以及自噬等减轻肺动脉高压^[14-16]。但有关 H_2S 改善肺动脉高压的机制仍未完全阐明。故本研究建立低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)大鼠模型, 检测 H_2S 对模型大鼠肺组织有氧糖酵解相关蛋白和细胞焦亡相关蛋白的影响, 探讨 H_2S 是否通过抑制有氧糖酵解-细胞焦亡改善 HPH, 为肺动脉高压的防治提供新方向和新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 7 周龄, 体重(180 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物科技有限公司, 动物使用许可证号: SCXK(浙)2024-0001。常规饲养于温州医科大学实验动物中心二层 SPF 级

大鼠专用动物房, 室内湿度 55%~65%, 温度(20 ± 2) °C。本研究实验动物方案获经温州医科大学动物伦理委员会批准, 并且按照《实验动物饲养管理和使用办法》进行。

1.2 主要试剂、仪器及配制

BCA 蛋白定量试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司, ECL 发光液购自杭州荃丹生物科技有限公司, Masson 染色试剂盒购自北京索莱宝公司, ELISA 试剂盒购自上海源桔生物科技中心, 所有抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。化学发光成像系统购自美国 GE Health, 倒置显微镜购自美国 Thermo Forma, 石蜡切片机购自德国 Leica 公司。NaHS 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。NaHS 配制终浓度为 0.2 mol/L 的溶液, 在超净工作台上使用孔径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 保存于 -20 °C 冰箱, 配制时避光。

1.3 实验分组和处理

将雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只: 正常对照组、正常+NaHS 组、低氧组和低氧+NaHS 组。正常对照组大鼠置于常氧(21% O₂)环境中, 每日腹腔注射等体积生理盐水; 正常+NaHS 组大鼠置于常氧环境中, 每天腹腔注射 14 μmol/kg NaHS; 低氧组大鼠置于缺氧箱中, 箱内氧气控制器通过控制 N₂ 流速使得氧浓度维持在 9%~10%, 每天腹腔注射等体积生理盐水; 低氧+NaHS 组大鼠同样置于缺氧箱中, 每天腹腔注射 14 μmol/kg NaHS。根据本研究组之前对于 H₂S 相关课题的研究以及相关参考文献^[17], 本研究选择 NaHS 腹腔注射浓度为 14 μmol/kg。以上 4 组大鼠常规饲养, 造模 4 周后, 进行后续检测。

1.4 大鼠肺动脉平均压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)检测

将大鼠麻醉后将其固定在实验台上, 颈部剪毛, 用手术剪刀剪开颈部正中的皮肤, 分离右侧皮下组织, 即可以看到颈外静脉, 游离大鼠颈外静脉。将导管插入大鼠右侧颈外静脉, 缓慢推进导管经右心房、右心室进入肺动脉, 随后将导管头端旋转继续插管, 继续插入大概 2 cm 的位置出现右心房波形, 随即将导管进行 90° 旋转后向前推进, 出现右心室波形, 继续插管 1~2 cm 即可见受呼吸影响较为明显的肺动脉波, 在波形稳定后, 记录大鼠的 mPAP。

1.5 右心肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)检测

记录大鼠 mPAP 之后, 快速剪开大鼠胸腔, 小

心取出心脏和肺。将心脏与肺组织分离, 剪去心房后, 分离右心室(RV)与左心室和室间隔(LV + S)并称重, 生理盐水清洗后, 使用医用滤纸吸干表面血液, 称重并计算 RVHI = RV / (LV + S)。

1.6 HE 染色观察肺组织病理改变程度

将肺组织以脱蜡、染色、脱水、透化、封片的步骤制成石蜡切片, 置于光镜下观察, 用 Image-Pro Plus v7.0 测量和计算肺血管的管壁厚度百分比(管壁面积 / 血管总面积 × 100%)。

1.7 Masson 染色观察肺组织纤维化情况

常规石蜡板包埋, 切片(厚度为 5 μm), 按说明书进行染色。在光镜下察肺动脉血管纤维化程度, 拍照采集, 运用 ImageJ 软件分析阳性面积并统计。

1.8 Western blot 检测糖酵解、细胞焦亡相关蛋白的表达

称取一定量的肺组织, 常规提取组织蛋白, BCA 定量, 加上 Loading Buffer (5×)后金属孵育器 100 °C 10 min 变性。配制 SDS-PAGE 电泳凝胶, 上样, 电泳, 转膜, 再用牛奶封闭 2 h, 封闭完成后用 TBST 洗膜 3 次, 加入抗己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)、丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH)、丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)、NLRP3、GSDMD 蛋白 N-端片段 (GSDMD-N-terminal domain, GSDMD-N)、Caspase-1、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 和 IL-18 抗体(均 1:1000), 孵育过夜。隔天用 TBST 洗涤 3 次, 每次 4 min, 随后二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, ECL 发光液孵育 20 min, 拍照后用 ImageJ 进行定量分析。以 β-actin 为内参蛋白, 计算目的蛋白相对表达水平。

1.9 ELISA 检测肺组织 IL-1β、IL-18 含量

本研究采用双抗体夹心法测定大鼠肺组织中 IL-1β、IL-18 含量。按标准品加样、加样、加酶、温育、配液、洗涤、显色、终止、测定的步骤操作, 根据测量各孔的吸光度绘制曲线并计算样品中目的蛋白含量。

1.10 统计学分析

数据用以 mean ± SEM 表示, 数据统计采用 Graphpad Prism 9.0 软件。用 Shapiro-Wilk 法检测数据正态性, 当数据呈正态分布时, 两组间均数比较采用 Student's *t* 检验, 三组及三组以上均数间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 法, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂S改善大鼠HPH

2.1.1 H₂S对大鼠mPAP和RVHI的影响

与正常对照组相比,低氧组mPAP和RVHI显著上升($P < 0.001$, 图1A、B),正常+NaHS组mPAP和RVHI无明显变化(图1A、B);与低氧组相比,低氧+NaHS组mPAP和RVHI显著降低(图1A、B)。

2.1.2 H₂S对低氧诱导的大鼠肺血管重构的影响

HE和Masson染色结果显示,与正常对照组相比,低氧组肺血管壁显著增厚、管腔狭窄以及胶原纤维明显增多,正常+NaHS组肺血管壁以及胶原纤维无明显变化;与低氧组相比,低氧+NaHS组肺血管壁增厚和管腔狭窄得到明显改善,胶原纤维明显减少(图2)。

2.2 有氧糖酵解和细胞焦亡相关蛋白在HPH中的变化及H₂S的干预作用

Western blot结果显示,与正常对照组相比,低氧组的HK2、PKM2表达显著上调($P < 0.001$),PDH表达显著下调($P < 0.0001$, 图3A);与低氧组相比,低氧+NaHS组的HK2、PKM2表达显著下调($P < 0.01$),PDH表达显著上调($P < 0.0001$, 图3A)。以上结果显示有氧糖酵解相关蛋白在HPH中发生相应变化,提示有氧糖酵解效应在HPH中出现上调,而H₂S可以逆转这一现象。与此同时,与正常对照组相比,低氧组的细胞焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18表达显著上调($P < 0.01$, $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$, 图3B);与低

氧组相比,低氧+NaHS组的细胞焦亡相关蛋白表达均显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图3B),以上结果显示细胞焦亡相关蛋白在HPH中表达上调,而H₂S可以逆转这一现象。

2.3 ELISA法检测各组大鼠肺组织的IL-1 β 、IL-18含量

ELISA试剂盒检测结果显示,与正常对照组相比,低氧组大鼠肺组织IL-1 β 、IL-18含量显著提高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),正常+NaHS组IL-1 β 、IL-18含量无明显变化;与低氧组相比,低氧+NaHS组IL-1 β 、IL-18含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图4A、B)。

3 讨论

肺动脉高压的特征是远端肺动脉循环的进行性闭塞性血管病变,通常导致右心室衰竭和死亡^[18]。而肺动脉高压的病理生理学是复杂多样的。H₂S被发现是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)之后的第三种气体信号分子,广泛参与人体内各种系统的调节^[10]。研究表明,H₂S对血管细胞过程有重要影响,如炎症、凋亡、细胞周期、细胞保护、线粒体代谢功能和生物发生^[19]。本研究结果表明,H₂S可逆转低氧诱导肺动脉高压大鼠发生的心肺组织改变,从而改善大鼠心肺功能。

Warburg效应指的是细胞在有氧状态下依然以糖酵解为主要产能方式,而不是通常的氧化磷酸化

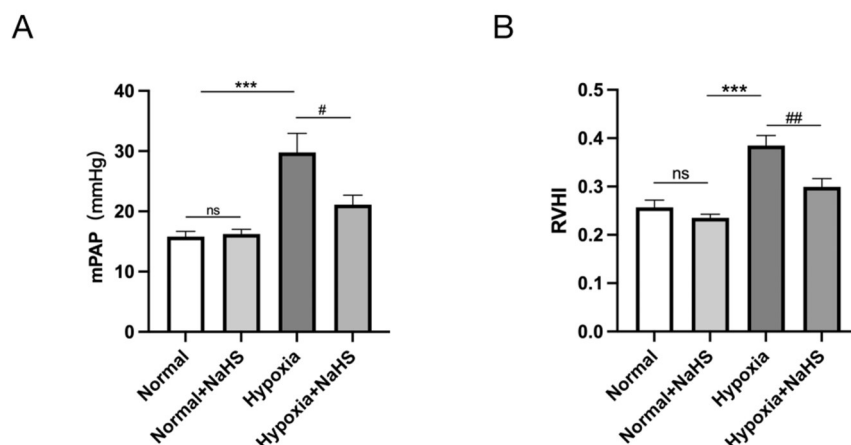


图 1. H₂S对低氧性肺动脉高压(HPH)大鼠肺血流动力学指标的影响

Fig. 1. Effect of H₂S on hemodynamic indexes in hypoxic pulmonary hypertension (HPH) rats. A: Mean pulmonary arterial pressure (mPAP); B: Right ventricular hypertrophy index (RVHI). Mean $\pm$ SEM, $n = 5-6$. *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ns, non-significant.

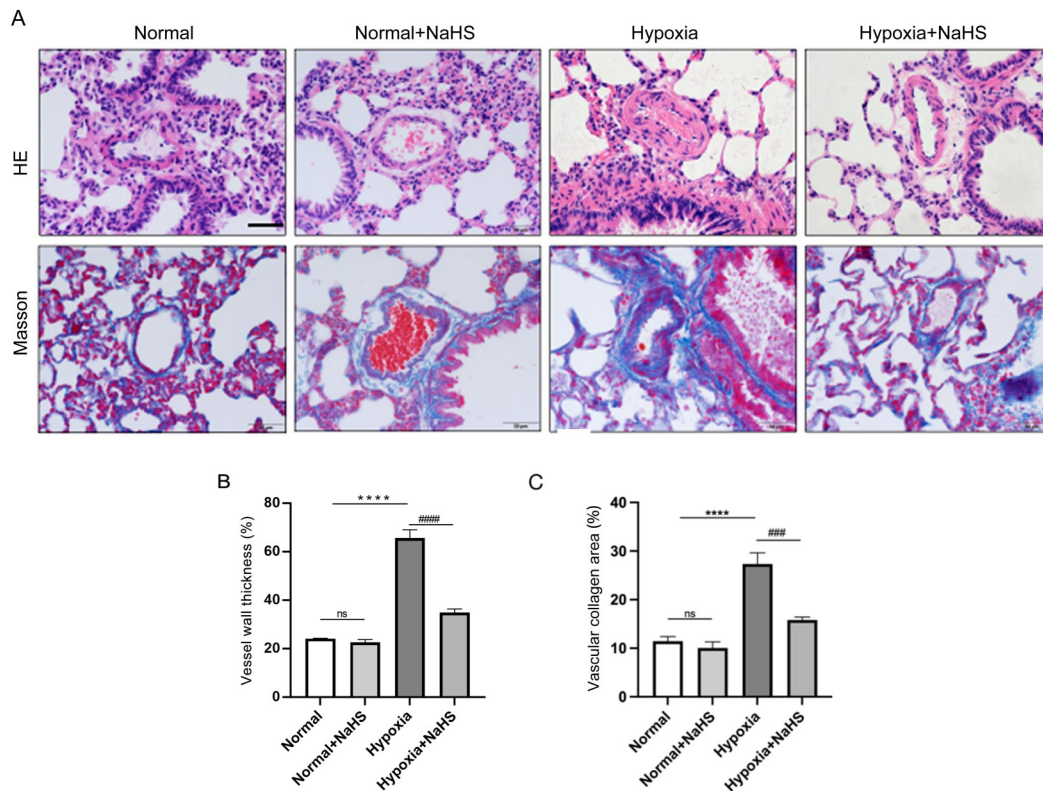


图 2. H_2S 对低氧性肺动脉高压(HPH)大鼠肺血管重构的影响

Fig. 2. Effects of H_2S on remodeling in hypoxic pulmonary hypertension (HPH) rats. *A*: Representative images of HE and Masson staining. Scale bar, 50 μm ; *B*: Percentage of vessel wall thickness (wall/total vessel area $\times$ 100%); *C*: Vascular collagen area. Mean $\pm$ SEM, $n = 4$. **** $P < 0.0001$; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$; ns, non-significant.

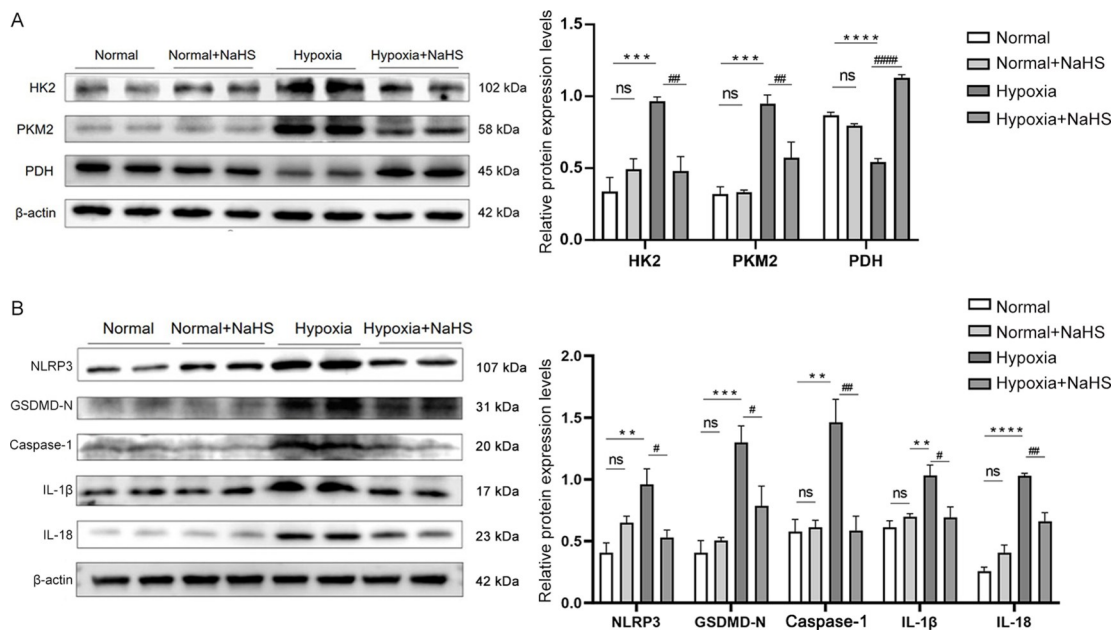


图 3. 各组大鼠肺组织中有氧糖酵解以及焦亡相关蛋白的表达变化

Fig. 3. Changes of protein expression levels of aerobic glycolysis and pyroptosis-related proteins in lung tissue of rats in each group detected by Western blot. *A*: Protein expression levels of aerobic glycolysis-related proteins in lung tissue of rats; *B*: Protein expression levels of pyroptosis-related proteins in lung tissue of rats. Mean $\pm$ SEM, $n = 4$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$; ns, non-significant.

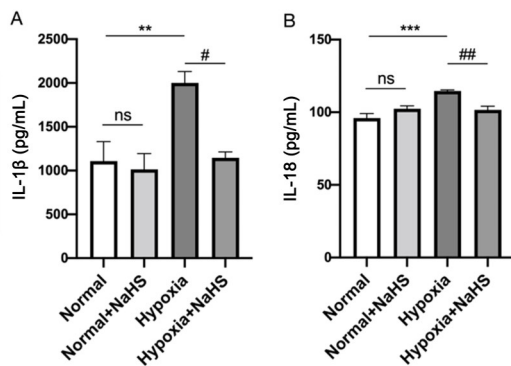


图 4. 各组大鼠肺组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18 含量变化

Fig. 4. Changes in contents of interleukin-1 β (IL-1 β , A) and IL-18 (B) in lung tissue of rats in each group detected by ELISA. Mean $\pm$ SEM, $n = 4$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ns, non-significant.

途径, 这一过程改变了细胞的能量代谢模式, 使其更倾向于利用糖酵解快速生成 ATP [20]。已有研究证实, Warburg 效应在肿瘤的演进中扮演关键角色, 它促使肿瘤细胞过度增殖, 还影响肿瘤血管的生成和免疫微环境。研究表明, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、TLR4 (Toll-like receptor 4) 信号通路与脂肪和糖类的代谢存在紧密关联。有氧糖酵解的终产物乳酸可促进炎症因子的释放, 且通过抑制 Caspase-1 可逆转乳酸的效应 [21]。NLRP3/Caspase-1/GSDMD 是介导细胞焦亡的重要通路, 一般来说, Caspase-1 由 NLRP3 激活, 进而触发 GSDMD 活化, GSDMD 是焦亡的执行蛋白, 由 Caspase-1 切割 GSDMD 前体生成 GSDMD-N, 进而释放 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 等大量促炎细胞因子 [22]。He 等人发现, LPS 可能通过激活 PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 通路介导肺成纤维细胞发生有氧糖酵解, 而抑制有氧糖酵解可逆转肺纤维化 [23]。Bibil 等研究显示, 肺动脉高压内皮细胞发生糖酵解, 且 microRNA-124 可以抑制这一现象 [24]。以上研究提示有氧糖酵解与细胞焦亡存在一定的联系。本研究结果显示, 在低氧诱导的肺动脉高压中, 有氧糖酵解效应和细胞焦亡效应均增强, 这可能是肺动脉高压的致病机制, 而 H₂S 可能通过抑制有氧糖酵解效应以及 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路来减轻低氧诱导的肺动脉高压。

本研究在大鼠 HPH 模型上探讨 HPH 机制, 结果显示, 低氧组大鼠肺血管壁显著增厚、管腔狭窄

以及胶原纤维明显增多; 有氧糖酵解以及细胞焦亡相关蛋白水平显著上调; 肺组织 IL-1 β 和 IL-18 含量升高, 而低氧+NaHS 组大鼠肺血管壁增厚和管腔狭窄得到明显逆转, 胶原纤维明显减少, 有氧糖酵解和细胞焦亡相关蛋白表达水平均显著下调, 表明抑制有氧糖酵解可改善大鼠肺损伤, 其机制可能与减轻细胞焦亡有关。

综上所述, 本研究结果表明, 低氧可上调有氧糖酵解和细胞焦亡, 从而诱导大鼠 HPH; H₂S 处理可缓解 HPH, 其机制可能与其抑制有氧糖酵解-细胞焦亡有关。本研究在动物实验中初步探讨了 H₂S 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

- Noordegraaf AV, Groeneveldt JA, Bogaard HJ. [Pulmonary hypertension](#). Eur Respir Rev 2016; 25(139): 4-11.
- Kovacs SB, Miao EA. [Gasdermins: Effectors of pyroptosis](#). Trends Cell Biol 2017; 27(9): 673-684.
- Zhang M, Xin W, Yu Y, Yang X, Ma C, Zhang H, Liu Y, Zhao X, Guan X, Wang X, Zhu D. [Programmed death-ligand 1 triggers PASMCs pyroptosis and pulmonary vascular fibrosis in pulmonary hypertension](#). J Mol Cell Cardiol 2020; 138: 23-33.
- He S, Ma C, Zhang L, Bai J, Wang X, Zheng X, Zhang J, Xin W, Li Y, Jiang Y, Wang S, Zhu D. [GLI1-mediated pulmonary artery smooth muscle cell pyroptosis contributes to hypoxia-induced pulmonary hypertension](#). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2020; 318(3): L472-L482.
- Wu Y, Pan B, Zhang Z, Li X, Leng Y, Ji Y, Sun K, Chen AF. [Caspase-4/11-mediated pulmonary artery endothelial cell pyroptosis contributes to pulmonary arterial hypertension](#). Hypertension 2022; 79(3): 536-548.
- Wang R, Wang SY, Wang Y, Xin R, Xia B, Xin Y, Zhang T, Wu YH. [The Warburg effect promoted the activation of the NLRP3 inflammasome induced by Ni-refining fumes in BEAS-2B cells](#). Toxicol Ind Health 2020; 36(8): 580-590.
- Icard P, Lincet H, Wu Z, Coquerel A, Forgez P, Alifano M, Fournel L. [The key role of Warburg effect in SARS-CoV-2 replication and associated inflammatory response](#). Biochimie 2021; 180: 169-177.
- Xie M, Yu Y, Kang R, Zhu S, Yang L, Zeng L, Sun X, Yang M, Billiar TR, Wang H, Cao L, Jiang J, Tang D. [PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation](#). Nat Commun 2016; 7: 13280.
- Liu N, Parry S, Xiao Y, Zhou S, Liu Q. [Molecular targets of the Warburg effect and inflammatory cytokines in the pathogenesis of pulmonary artery hypertension](#). Clin Chim Acta

- 2017; 466: 98-104.
- 10 Lv B, Chen S, Tang C, Jin H, Du J, Huang Y. Hydrogen sulfide and vascular regulation - An update. *J Adv Res* 20212; 7: 85-97.
 - 11 Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. [Toxicology of hydrogen sulfide](#). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 109-134.
 - 12 Zhang D, Wang X, Chen S, Chen S, Yu W, Liu X, Yang G, Tao Y, Tang X, Bu D, Zhang H, Kong W, Tang C, Huang Y, Du J, Jin H. [Endogenous hydrogen sulfide sulphydrates IKK \$\beta\$ at cysteine 179 to control pulmonary artery endothelial cell inflammation](#). *Clin Sci (Lond)* 2019; 133(20): 2045-2059.
 - 13 Zhang H, Hao LZ, Pan JA, Gao Q, Zhang JF, Kankala RK, Wang SB, Chen AZ, Zhang HL. [Microfluidic fabrication of inhalable large porous microspheres loaded with H₂S-releasing aspirin derivative for pulmonary arterial hypertension therapy](#). *J Control Release* 2021; 329: 286-298.
 - 14 Wu J, Pan W, Wang C, Dong H, Xing L, Hou J, Fang S, Li H, Yang F, Yu B. [H₂S attenuates endoplasmic reticulum stress in hypoxia-induced pulmonary artery hypertension](#). *Biosci Rep* 2019; 39(7): BSR20190304.
 - 15 Zhang H, Lin Y, Ma Y, Zhang J, Wang C, Zhang H. [Protective effect of hydrogen sulfide on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibition of the endothelial mesenchymal transition](#). *Int J Mol Med* 2019; 44(6): 2091-2102.
 - 16 Li Y, Liu G, Cai D, Pan B, Lin Y, Li X, Li S, Zhu L, Liao X, Wang H. [H₂S inhibition of chemical hypoxia-induced proliferation of HPASMCs is mediated by the upregulation of COX-2/PGL₂](#). *Int J Mol Med* 2014; 33(2): 359-366.
 - 17 Liu JJ (刘军杰), Huang GX, Li J, Zhang X, Xie L. Protective effect of hydrogen sulfide on mitochondrial damage of smooth muscle cells of rats with high pulmonary blood flow pulmonary hypertension and its mechanism. *J Jilin Univ Med Ed (吉林大学学报医学版)* 2014; 40(3): 593-597 (in Chinese).
 - 18 Xiong Q, Wang Z, Yu Y, Wen Y, Suguro R, Mao Y, Zhu YZ. [Hydrogen sulfide stabilizes atherosclerotic plaques in apolipoprotein E knockout mice](#). *Pharmacol Res* 2019; 144: 90-98.
 - 19 Rose P, Moore PK, Zhu YZ. [H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies](#). *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(8): 1391-1412.
 - 20 Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. [Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide *in vitro* and its measurement *in vivo*: a review](#). *Free Radic Biol Med* 2009; 47(10): 1346-1353.
 - 21 Huang P, Chen S, Wang Y, Liu J, Yao Q, Huang Y, Li H, Zhu M, Wang S, Li L, Tang C, Tao Y, Yang G, Du J, Jin H. [Down-regulated CBS/H₂S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats](#). *Nitric Oxide* 2015; 46: 192-203.
 - 22 Hou J, Hsu JM, Hung MC. [Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in inflammation and antitumor immunity](#). *Mol Cell* 2021; 81(22): 4579-4590.
 - 23 Hu X, Xu Q, Wan H, Hu Y, Xing S, Yang H, Gao Y, He Z. [PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis](#). *Lab Invest* 2020; 100(6): 801-811.
 - 24 Bibli SI, Hu J, Sigala F, Wittig I, Heidler J, Zukunft S, Tsilimigras DI, Randriamboavonjy V, Wittig J, Kojonazarov B, Schürmann C, Siragusa M, Siuda D, Luck B, Abdel Malik R, Filis KA, Zografos G, Chen C, Wang DW, Pfeilschifter J, Brandes RP, Szabo C, Papapetropoulos A, Fleming I. [Cystathionine \$\gamma\$ lyase sulphydrates the RNA binding protein human antigen R to preserve endothelial cell function and delay atherogenesis](#). *Circulation* 2019; 139(1): 101-114.