

RhoA/ROCK/ERK-MAPK 通路在高磷环境调节内皮细胞凋亡的机制

黄大祥, 李梦媛, 秦 岭, 彭 艾

[摘要]目的 研究高磷环境下内皮细胞凋亡的可能调控机制和信号通路。方法 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)在正常磷(1.0 mmol/L)、高磷(3.0 mmol/L)、正常磷+辛伐他汀(simvastatin, SV, 1.0 mmol/L+SV)及高磷+SV(3.0 mmol/L+SV)培养基中培养24 h, Western Blot评价Ras同源物基因家族成员A(Ras homolog gene family, member A, RhoA), Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1/2(rho-associated coiled coil forming protein kinase 1/2, ROCK1/2), 细胞外信号调控激酶-丝裂原活化蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase-mitogen activated protein kinase, ERK-MAPK)、磷酸化细胞外信号调控激酶-丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated-ERK-MAPK, p-ERK-MAPK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38-Mitogen Activated Protein Kinase, p38-MAPK)、磷酸化p38-丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated-p38-MAPK, p-p38-MAPK)、以及精氨酸酶1(arginase1, ARG1)和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)蛋白的表达, 比色法和膜联蛋白V/碘化丙啶双染法(Annexin V-FITC/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)检测ARG活性和细胞凋亡率。结果 高磷组RhoA, ROCK1/2, p-ERK MAPK, ARG1表达均上调, ARG活性升高, NOS表达下调, 细胞凋亡增加; RhoA抑制剂SV能抑制高磷环境下p-ERK MAPK的活化和ARG1的表达, 降低ARG1活性, 促进NOS表达, 减少内皮细胞凋亡。结论 高磷环境HUVECs可通过RhoA/ROCK途径激活p-ERK MAPK的表达, 增加ARG活性, 抑制NOS表达, 引起内皮细胞凋亡; SV可以通过抑制RhoA/ROCK/ERK-MAPK通路, 改善内皮细胞凋亡。

[关键词] 高磷; Ras同源物基因家族成员A; 磷酸化细胞外信号调控激酶; 精氨酸酶; 内皮细胞

[中图分类号] R543

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2021)04-223-4

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2021.04.005

A Study on the mechanism of high phosphorus regulating endothelial cell apoptosis through RhoA/ROCK/ERK-MAPK pathway

HUANG Daxiang¹, LI Mengyuan², QIN Ling², PENG Ai²

(1. Department of Nephrology, Shanghai Tenth People's Hospital, Chongming Branch, Shanghai 202157, China;

2. Department of Nephrology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China)

[Abstract] **Objective** To study the exact mechanism of high phosphorus on endothelial cell apoptosis and functional disorders. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and divided into normal phosphorus concentration (1.0 mmol/L), high phosphorus concentration (3.0 mmol/L), normal phosphorus plus simvastatin (1.0 mmol/L+SV) and high phosphorus plus simvastatin (3.0 mmol/L+SV). Western blot was used to evaluate Ras homolog gene family, member A (RhoA), Rho-associated Coiled Coil Forming Protein Kinase 1/2 (ROCK1/2), Extracellular signal-Regulated Kinase-Mitogen Activated Protein Kinase (ERK-MAPK), phosphorylated-ERK-MAPK (p-ERK-MAPK), p38-Mitogen Activated Protein Kinase (p38-MAPK, phosphorylated-p38-Mitogen Activated Protein Kinase (p-p38-MAPK), arginase (Arginase1, ARG1) and nitric oxide synthase (NOS) protein expression. Colorimetry was used to assay the activity of arginase. Annexin V-FITC/propidium iodide (AnnexinV-FITC/PI) double staining was used to assess the apoptosis of cells. **Results** RhoA, ROCK1/2, p-ERK MAPK, and ARG1 protein was up-regulated, and the expression of NOS was down-regulated in the high phosphorus group; the RhoA inhibitor simvastatin can inhibit the activation of p-ERK MAPK and the expression of ARG1, promote the expression of NOS and decreased the endothelial cells apoptosis of the high phosphorus group. **Conclusion** HUVECs may activate the expression of p-ERK

[基金项目] 上海市崇明区科学技术委员会“可持续发展科技创新行动计划”(CKY2018-24);上海市第十人民医院自然培育项目-面上A类(04.03.19.101)

[作者单位] 202157 上海,上海市第十人民医院崇明分院肾脏科(黄大祥); 200072 上海,同济大学附属第十人民医院肾脏科(李梦媛,秦岭,彭艾)

[通讯作者] 秦 岭, E-mail: qinling@tongji.edu.cn

MAPK through the RhoA/ROCK pathway to regulate arginase activity under high phosphorus environment, thereby inhibiting the activity of NOS, causing endothelial cell apoptosis. Simvastatin can decrease the apoptosis of endothelial cells by inhibiting RhoA/ROCK/ERK-MAPK pathway.

[**Key words**] High phosphorus; Ras homolog gene family, member A, (RhoA); Extracellular signal-regulated kinase(ERK); Arginase(ARG); Endothelial cells

高血磷是慢性肾脏病 (chronic kidney diseases, CKD) 患者常见的电解质紊乱, 50% 以上的透析患者合并血磷升高, 被称为沉默杀手^[1]。无论是对于 CKD 3~4 期的患者、透析患者或肾功能正常者, 血磷均与血管钙化和心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 死亡率呈正相关^[2-4]。因此, 高血磷是 CKD 患者 CVD 高发病率和死亡率高危因素。

内皮细胞功能障碍和凋亡是 CVD 的早期事件和始动环节。临床研究表明, 正常人即使短期摄入高磷饮食, 也能损害内皮细胞功能, 影响血管舒张^[5]; 高血压人群即使血磷在正常水平, 血磷浓度依然和内皮细胞功能障碍呈正相关^[6]。但高血磷造成内皮细胞凋亡和功能障碍的具体分子机制尚未明确。前期的研究中, 代谢组学被用来揭示不同磷浓度下内皮细胞氨基酸谱的差异表达^[7]。研究发现高磷能在体外诱导内皮细胞凋亡, 并推测其可能的机制是通过调节 MAPK 通路诱导内皮细胞凋亡^[8]。然而, 其上下游调控蛋白尚不清楚。本研究用体外高磷培养液刺激人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 检测 Ras 同源物基因家族成员 A (Ras homolog gene family, member A, RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1/2 (Rho-associated coiled coil forming protein kinase 1/2, ROCK1/2)/ 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路相关蛋白的表达, 评估 ARG 的活性和细胞的凋亡情况, 并进一步通过 RhoA 抑制剂 SV 抑制 RhoA/ROCK 通路, 明确 RhoA/ROCK/MAPK 通路在高磷诱导内皮细胞凋亡中的作用。本研究为进一步阐明高磷环境下内皮细胞凋亡的分子机制提供了理论基础和实验证据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 兔抗人细胞外信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 磷酸化细胞外信号调控激酶 (phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK), p38, 磷酸化 p38 (phosphorylated p38, p-p38), 精氨酸酶 1 (arginase 1, ARG1), 一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抗体, 鼠抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG, 辣根过氧化物酶

标记山羊抗兔 IgG (美国 Cell Signaling Technology 公司); 内皮细胞培养液 (美国 Lonza Walkersville 公司), RhoA 抑制剂辛伐他汀 (simvastatin, SV) 标准品 (美国 Sigma 公司); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (上海碧云天公司); 奥德赛凝胶成像系统 (美国 LI-COR 公司)。电泳仪, 电泳槽, 比色仪, 细胞凋亡检测试剂盒及流式细胞仪均购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养及处理 HUVEC (中国科学院细胞库) 在标准条件下用培养液传代, 细胞按处理条件分为正常磷组 (1.0 mmol/L), 高磷组 (3.0 mmol/L), 正常磷+SV (1.0 mmol/L+SV), 高磷+SV (3.0 mmol/L+SV) 培养 24 h, SV 在培养液中的浓度为 100 μ g/mL。

1.3 实验方法

1.3.1 Western 印迹法 收取各组 HUVEC, 提取总蛋白, 检测蛋白浓度 (BCA 法), SDS PAGE 电泳, 转膜, 5% 牛血清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭, 2 h 后分别加入一抗 ERK (1:1 000)、p-ERK (1:800)、p38MAPK (1:1 000)、p-p38MAPK (1:800)、ARG1 (1:500)、NOS (1:800)、 β -actin (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 5% 牛血清白蛋白稀释二抗 (兔抗 1:3 000, 鼠抗 1:3 000), 室温孵育, 1 h 后洗膜。扫描采用奥德赛凝胶成像系统, β -actin 为内参, 灰度分析使用 Image J 软件。

1.3.2 ARG 活性测定 通过比色测定法测定 HUVEC 的 ARG 活性。将 75 μ L, 10 mM MnCl₂ (pH 7.5) 添加到细胞匀浆中, 加热至 56 $^{\circ}$ C、10 min, 加入 50 μ L L-精氨酸 (pH 9.7), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 终止液结束反应。加入 25 μ L α -异亚硝基苯乙酮, 100 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。然后将混合物加载到离心过滤器上, 并在室温下以 5 000 \times g 离心 5 min, 分光光度计中 540 nm 下测定滤液中尿素的浓度, 根据尿素生成速度表示 ARG 活性。

1.3.3 AnnexinV-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡 收集各组 HUVEC, 室温下离心 (1 000 r/min 离心 5 min), 4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤细胞 2 次, 将 5 μ L AnnexinV-FITC 暗处混匀, 室温孵育 15 min, 流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件统计和绘图。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 组间均数差异比较采用 *t* 检验, 多组间均数差异比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western 评估蛋白表达情况 高磷 RhoA 和 ROCK1/2 的表达较正常磷增加,图 1。

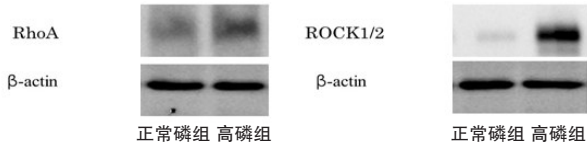


图 1 不同磷浓度组的 RhoA 和 ROCK1/2 的表达情况

高磷能激活 ERK MAPK 的表达(正常磷组比高磷组 $t=20.78, P<0.0001$), SV 抑制高磷组 ERK MAPK 的磷酸化(高磷组比高磷+SV 组, $t=7.746, P=0.0015$),图 2A;高磷能抑制 p38 MAPK 的表达(正常磷组比高磷组, $t=20.7, P<0.0001$),而对 p38 MAPK 的磷酸化无影响 $P>0.05$,图 2B;高磷组 ARG1 的表达高于正常磷组(正常磷组比高磷组, $t=10.78, P=0.0004$),图 2C;NOS 的表达低于正常磷组(正常磷组比高磷组, $t=28.32, P<0.0001$),图 2D;SV 能抑制 ARG1 和增强 NOS 的表达(高磷组比高磷+SV 组, $t=7.071, P=0.0021$,图 2C;高磷组比高磷+SV 组, $t=7.762, P=0.0002$,图 2D)。

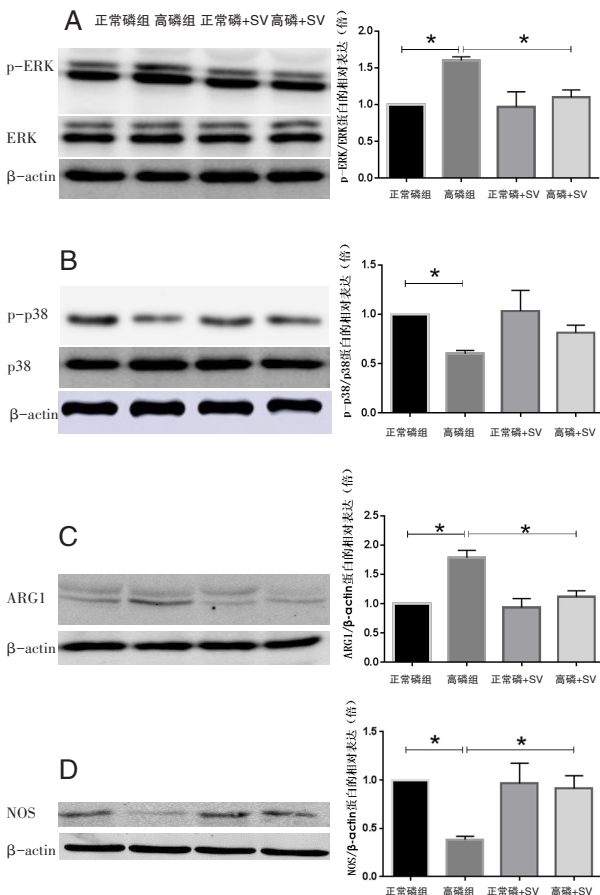


图 2 A 各组细胞 ERK MAPK、p38 MAPK、ARG1 及 NOS 蛋白表达情况

*代表 $P<0.05$

2.2 ARG 活性评估 和正常磷组 ARG 活性比较,

高磷组 ARG 活性明显升高(正常磷组比高磷组, $t=10.58, P=0.0005$),而 SV 可以抑制高磷组 ARG 活性(高磷组比高磷+SV 组, $t=6.501, P=0.0029$),图 3。

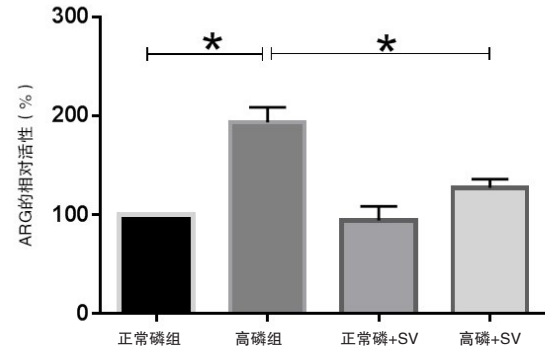


图 3 各组 HUVEC 的 ARG 活性比较

*代表 $P<0.05$

2.3 细胞凋亡评估 高磷组 HUVEC 的细胞凋亡明显高于正常磷组(正常磷组比高磷组 0.8% 比 9.0%, $P<0.001$);SV 降低高磷 HUVEC 的凋亡(高磷组比高磷+SV 组 9.0% 比 3.8%, $P=0.015$),图 4。

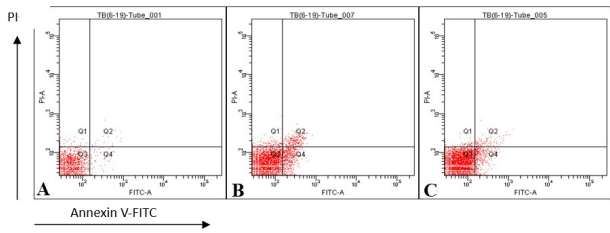


图 4 AnnexinV-FITC /PI 双染法评估各组 HUVEC 凋亡情况

A:正常磷组;B:高磷组;C:高磷+SV

3 讨论

高血磷是 CKD 常见的代谢异常,也是 CKD 患者发生 CVD 的独立危险因素^[1]。内皮细胞功能障碍和凋亡是 CVD 的早期事件和始动环节;但高磷如何导致内皮细胞功能障碍和凋亡的机制尚不明确。有研究提出:高磷促进内皮细胞氧化应激水平,增加 ROS 产生,阻断线粒体膜电位,活化 cas - pasc 诱导细胞凋亡^[9]。前期的研究证实:高磷可能通过激活 MAPK 通路调节 HUVEC 凋亡,但其具体调控通路并未进一步深入研究。

ARG 能将精氨酸水解成鸟氨酸和尿素,参与鸟氨酸循环。ARG 和 NOS 同时以精氨酸为底物,ARG 活性增加可能竞争性抑制 NOS 合成,减少 NO 的生成,导致内皮细胞功能障碍和凋亡;抑制 ARG 活性可促进内皮细胞产生 NO,改善内皮细胞功能,减少细胞凋亡^[10]。目前,ARG 已经成为治疗多种心血管疾病的新靶点^[11]。本研究小组曾经报道高磷环境下内皮细胞鸟氨酸,瓜氨酸的表达增加而精氨酸表达减少。本研究推测高磷可能通过提高 ARG 的活性增加精氨酸的降解,降低精氨酸含量。本研

究也发现:高磷环境下内皮细胞的 ARG 活性以及 ARG1 的蛋白表达均增加,证实了上述推测。

RhoA/ROCK 途径可以调节 ARG 活性,调节内皮细胞功能^[12]。在血管平滑肌细胞,高磷能激活 ROCK 通路,促进平滑肌细胞的钙化和凋亡^[13]; RhoA 作为 p-38 MAPK, ERK-MAPK 的调控蛋白,可以调节平滑肌细胞的分化^[14];然而,在高磷环境下内皮细胞 RhoA/ ROCK/ MAPK 信号的激活情况尚无报道。本研究发现,高磷环境下 HUVECs 的 RhoA、ROCK1/2 蛋白及下游 p-ERK 的表达增加, RhoA 抑制剂 SV 可抑制 p-ERK 蛋白的表达;尽管高磷组 p-p38 的表达低于正常磷,但 RhoA 抑制剂 SV 并未改变其表达。因此,本研究认为,虽然都是通过 MAPK 通路进行调控,但和平滑肌细胞的调控通路不同,高磷环境下 RhoA/ ROCK 是通过调节 ERK MAPK 通路来调节内皮细胞功能的。另外,本研究中高磷组 ARG1 的表达升高, ARG 活性增加, eNOS 的表达减少,提示:高磷条件下 HUVEC 可通过 RhoA/ROCK 途径激活 p-ERK MAPK 的表达,调节 ARG 活性,抑制 NOS 活性,引起内皮细胞凋亡和功能障碍。曾有研究报道:血管紧张素 II 可以通过 RhoA/ROCK/p-38 MAPK 途径提高 ARG 活性,从而导致 NO 合成减少和内皮细胞功能障碍^[15]。此外高盐也可以激活 ROCK,通过调节不对称二甲基精氨酸导致内皮功能障碍^[16]。这些研究结果和本研究结果一致,都证实了 RhoA/ROCK/MAPK 通路参与调节内皮细胞的功能障碍。

SV 是临床上广泛应用的调脂药物。有研究证实:SV 可以改善高糖和氧化应激诱导的内皮细胞功能障碍^[17-18]。本研究发现:SV 作为 RhoA 的抑制剂,可能会通过抑制 RhoA/ROCK/MAPK 通路而改善高磷诱导的内皮细胞功能障碍,这一发现提示 SV 用于合并高血磷的 CKD 患者,可能有独立于调脂作用的临床获益。当然,需要前瞻性的临床研究来进一步明确上述可能性。

综上所述,本研究验证了高磷诱导内皮细胞凋亡的重要代谢途径。首次发现高磷条件下, HUVEC 的 RhoA/ROCK/ERK MAPK 通路能通过调节 ARG 活性抑制 NOS 活性,引起内皮细胞凋亡;SV 可以通过抑制 RhoA/ROCK/ERK-MAPK 通路,改善内皮细胞凋亡。这项研究将为阐明高磷诱导内皮细胞凋亡的分子机制奠定坚实的理论和实验基础,为研究和开发干预 CKD 患者高磷相关心血管疾病的新药提供新的潜在靶点。

【参考文献】

[1] St Peter WL, Wazny LD, Weinhandl ED. phosphate-Binder Use

In Us Dialysis Patients: Prevalence, Costs, Evidence, And Policies [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71 (2):246-253.

- [2] Lopes MB, Karaboyas A, Bieber B, et al. Impact of longer term phosphorus control on cardiovascular mortality in hemodialysis patients using an area under the curve approach: results from the DOPPS [J]. Nephrol Dial Transplant, 2020,35(10):1794 - 1801.
- [3] Kawamura H, Tanaka S, Ota Y, et al. Dietary intake of inorganic phosphorus has a stronger influence on vascular-endothelium function than organic phosphorus [J]. J Clin Biochem Nutr, 2018, 62(2): 167 - 173.
- [4] Spoenclin J, Paik JM, Tsacogianis T, et al. Cardiovascular Outcomes of Calcium-Free vs Calcium-Based Phosphate Binders in Patients 65 Years or Older With End-stage Renal Disease Requiring Hemodialysis [J]. JAMA Intern Med, 2019, 179(6): 741 - 749.
- [5] Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, et al. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(7): 1504-1512.
- [6] Peticone M, Maio R, Sciacqua A, et al. Serum phosphorus levels are associated with endothelial dysfunction in hypertensive patients [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2016, 26(8):683-688.
- [7] 唐波, 秦岭, 邓冰清, 等. 高磷诱导内皮细胞凋亡的代谢组学以及 MAPK 通路研究 [J]. 同济大学学报(医学版), 2014, 35(4), 35-40.
- [8] Qin L, Tang B, Deng B, et al. Extracellular regulated protein kinases play a key role via bone morphogenetic protein 4 in high phosphate-induced endothelial cell apoptosis [J]. Life Sci, 2015, 15 (131):37-43.
- [9] Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008,294(6):F1381-1387.
- [10] S Clemente G, van Waarde A, F Antunes I, et al. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective [J]. Int J Mol Sci, 2020,21(15): 5291.
- [11] Yao L, Chandra S, Toque HA, et al. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout [J]. Cardiovasc Res, 2013, 97(3): 509-519.
- [12] Seccia TM, Rigato M, Ravarotto V, et al. ROCK (RhoA/Rho Kinase) in cardiovascular - renal pathophysiology: a review of new advancements [J]. J Clin Med, 2020, 9(5): 1328.
- [13] Ouyang QF, Han Y, Lin ZH, et al. Fluvastatin upregulates the α 1C subunit of CaV1.2 channel expression in vascular smooth muscle cells via RhoA and ERK/p38 MAPK pathways [J]. Dis Markers, 2014,2014:237067.
- [14] Toque HA, Nunes KP, Yao L, et al. Activated Rho kinase mediates diabetes-induced elevation of vascular arginase activation and contributes to impaired corpora cavernosa relaxation: possible involvement of p38 MAPK activation [J]. J Sex Med, 2013, 10(6):1502-1515.
- [15] Shatanawi A, Romero MJ, Iddings JA, et al. Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(5):1181-1192.
- [16] Cao Y, Fang Y, Mu J, et al. High salt medium activates RhoA/ROCK and downregulates eNOS expression via the upregulation of ADMA [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1):606-612.
- [17] Lv ZH, Phuong TA, Jin SJ, et al. Protection by simvastatin on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction through inhibiting NLRP3 inflammasomes [J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91291 - 91305.
- [18] He Z, He X, Liu M, et al. Simvastatin Attenuates H2O2-Induced Endothelial Cell Dysfunction by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress[J]. Molecules, 2019, 24(9): 1782.