

血管紧张素 II 通过 ERK1/2 通路促进血管内皮细胞钙化

程治源¹, 叶挺², 凌秋洋², 吴婷², 马涛¹, 王倩¹, 宗刚军^{1,2}

摘要 目的 探讨血管紧张素 II 通过 ERK1/2 通路促进血管钙化的病理生理学机制。方法 体外培养 HUVECs 5 d 后,用不同浓度梯度血管紧张素 II 刺激内皮细胞,筛选出诱导血管内皮细胞钙化的最适浓度。用血管紧张素 II 刺激内皮细胞不同时间点(0、15、30、45、60 min),检测细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)通路磷酸化水平。用血管紧张素 II 诱导 5 d 的钙化内皮细胞分为 4 组:对照组(用 5% 胎牛血清的 ECM 培养液)、血管紧张素 II 组(100 nmol/L Ang II)、氯沙坦组(100 nmol/L Ang II + 1 μmol/L Losartan)、U0126 组(100 nmol/L Ang II + U0126 1 μmol/L)。通过 Western blot、ELISA 检测骨形态发生蛋白-2、-4(BMP2、BMP4)钙化因子表达来探讨血管紧张素 II 对血管内皮钙化的影响及其信号通路。结果 血管紧张素 II 增加人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的 BMP2、BMP4 钙化因子表达($P < 0.05$);而血管紧张素 II 1 型受体阻断剂和 ERK1/2 通路抑制剂 U0126 可下调血管紧张素 II 对血管内皮 BMP2、BMP4 的表达($P < 0.05$)。结论 血管紧张素 II 可诱导 HUVECs 钙化,其途径是通过 ERK1/2 通路促进血管内皮细胞钙化。

关键词 血管紧张素 II; 人脐静脉内皮细胞; 钙化; ERK1/2 通路

中图分类号 R 561.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)04-0542-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.010

血管钙化和动脉粥样硬化具有高度相关性,是预测心血管疾病发病率和死亡率的重要预测标志^[1-3]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)和骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)是转化因子 β 超家族成员细胞因子,在形成血管钙化的病理生理学过程中起到了重要作用^[4]。BMP2 和 BMP4 蛋白在血管及瓣膜中上调与氧化应激、炎症、高血糖、高血脂有

关^[5]。通过在血管损伤招募炎性细胞,血管紧张素 II 在血管炎症反应调控中扮演了重要作用。同时,血管紧张素 II 也能通过刺激转录因子的作用促进炎症介质的表达^[6]。然而,血管紧张素促进人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的 BMP2、BMP4 蛋白的表达具体机制尚不完全清楚。在动物模型中,血管紧张素 II 型受体阻断剂(氯沙坦)可以减少冠状动脉粥样硬化斑块的负荷^[7]。因此,对于血管紧张素 II 诱导内皮细胞钙化因子 BMP2、BMP4 的表达,氯沙坦可能有一些潜在的保护作用。在动物模型中,在多种促钙化因素刺激下, HUVECs 的细胞表型可由收缩型转化为成骨样细胞表型。血管紧张素 II 在血管钙化的发生和进展中起到了重要作用^[8]。本研究探讨血管紧张素 II 在血管钙化中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVECs 从上海江林生物科技有限公司进口。以 HUVECs 为研究对象,通过伦理委员会批准和国家有关生物制品进口审批手续,为合法进口生物材料。内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)从上海江林生物公司进口。血管紧张素 II 购自美国 Sigma 公司。BMP-2、BMP-4 抗体及 U0126 从艾博抗(Abcam, Cambridge, UK)公司进口, T-ERK、P-ERK 抗体从 CST(Cell signal technology, Shanghai, China)公司购买。ELISA 试剂盒从杭州联科生物公司购买,氯沙坦从默沙东医药公司购买,其他试剂从赛德生物公司(苏州)购买。

1.2 HUVECs 的培养 HUVECs 从上海江林生物科技有限公司购买, HUVECs 生长在 ECM 中,这种培养基含有 5% 胎牛血清、1% 内皮生长因子。将细胞加入 ECM 培养液后,在 37 °C 空气和 5% 二氧化碳混合气体中培养。待细胞长满培养瓶底 80% 左右进行传代,取 3~5 代呈融合的生长状态良好的细胞用于细胞实验,每 2 d 换 1 次液。实验采用 5~8 代 HUVECs。取 HUVECs,按 1×10^5 /ml 接种于 12 孔培养板中培养,连续培养 5 d。

1.3 实验分组

2018-01-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371657); 无锡市卫生计生委重大科研项目(编号: z201608)

作者单位: ¹ 安徽医科大学无锡临床学院心血管内科, 无锡 214044

² 解放军第 101 医院心血管内科, 无锡 214044

作者简介: 程治源,男,硕士研究生;

宗刚军,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: zonggj@163.com

1.3.1 按筛选不同浓度血管紧张素Ⅱ对血管钙化的影响分组 将培养5天的HUVECs分为5组:对照组、10 nmol/L血管紧张素Ⅱ、100 nmol/L血管紧张素Ⅱ、1 μ mol/L血管紧张素Ⅱ、10 μ mol/L血管紧张素Ⅱ。

1.3.2 按研究ERK1/2通路在其中的作用分组

①用血管紧张素Ⅱ刺激HUVECs 0、15、30、45、60 min不同时间点,检测ERK1/2通路的磷酸化水平。②将连续培养5d的HUVECs分为4组:对照组(用5%胎牛血清的ECM培养液)、血管紧张素Ⅱ组(100 nmol/L AngⅡ)、氯沙坦组(100 nmol/L AngⅡ+1 μ mol/L Losartan)、U0126组(100 nmol/L AngⅡ+U0126 1 μ mol/L)。培养5d的HUVECs,用Western blot和ELISA方法检测BMP2、BMP4的蛋白表达。

1.4 Western blot检测BMP2、BMP4、 β -actin、ERK1/2、P-ERK1/2蛋白的表达水平 收集培养5天的HUVECs,提取总蛋白,在预处理的细胞中加入100 μ l细胞裂解液,振荡器振荡至细胞裂解,加入25 μ l 5 $\times$ 上样缓冲液混匀。将蛋白标本置于100 $^{\circ}$ C水浴加热8 min后进行14 000 r/min离心5 min。用移液枪取10 μ l制备好的蛋白标本加到样品孔中进行电泳,结束后通过转膜将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移到PVDF膜上,用5% BSA封闭PVDF膜免疫球蛋白结合位点,然后孵一抗过夜,第2天洗膜后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,孵育结束后洗膜,最后加入曝光液,对PVDF膜进行曝光,用Image J软件(Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Md)对条带进行分析。

1.5 ELISA法定测定BMP2、BMP4分泌量 收集培养细胞上清标本,根据ELISA试剂盒的说明对细胞培养上清液中BMP2、BMP4的水平进行测定。使用全自动酶标仪(BIORAD680, Hercules, CA)在450 nm波长下进行读数并分析,根据标准曲线,计算分泌蛋白BMP2、BMP4的浓度。

1.6 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数进行方差齐性检验和单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。用GraphPad Prism 5.0统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素Ⅱ诱导HUVECs表达BMP2、BMP4最适浓度的筛选 培养5d的HUVECs,分别给予不同浓度梯度血管紧张素Ⅱ(10 nmol/L、100 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L)刺激HUVECs,发现

100 nmol/L组与其他各组比较,100 nmol/L血管紧张素Ⅱ诱导HUVECs上调BMP2、BMP4蛋白最显著,差异有统计学意义($F = 7.840, 1.539, P < 0.05$),见图1A。

2.2 血管紧张素Ⅱ通过ERK1/2通路调控钙化因子表达 ①Western blot检测ERK1/2通路磷酸化水平,发现100 nmol/L血管紧张素Ⅱ刺激HUVECs,15 min时磷酸化水平开始升高,在45 min时达到最高值,60 min时降低,在45 min时与0 min时比较,差异有统计学意义($F = 1.778, P < 0.05$),见图2。②Western blot及ELISA检测BMP2、BMP4蛋白,发现血管紧张素Ⅱ(100 nmol/L)刺激组BMP2、BMP4蛋白明显高于对照组(用5%胎牛血清的ECM培养液),差异有统计学意义($F = 36.00, 1.440, P < 0.05$);而且血管紧张素Ⅱ(100 nmol/L)刺激组上清蛋白BMP2、BMP4明显高于未特殊处理的对照组,差异有统计学意义($F = 1.033, 4.503, P < 0.05$),见图1B、1C。氯沙坦组(100 nmol/L AngⅡ+1 μ mol/L Losartan)和U0126组(100 nmol/L AngⅡ+U0126 1 μ mol/L)BMP2、BMP4蛋白较单纯血管紧张素Ⅱ(100 nmol/L)刺激组下降,差异有统计学意义($F = 4.000, 4.000, 25.00, 6.250, P < 0.05$),见图3A,而且上清蛋白BMP2、BMP4蛋白较单纯血管紧张素Ⅱ(100 nmol/L)刺激组下降,差异有统计学意义($F = 6.857, 2.228, 3.123, 23.160, P < 0.05$),见图3B、3C。

3 讨论

在动脉粥样硬化、慢性肾脏病、高血压、糖尿病中血管钙化是很常见的血管病变。血管钙化与心血管疾病的高发病率和死亡率直接相关。目前仍然缺少有效的可行的治疗方法去治疗或者阻断血管钙化的发展。

血管钙化是一个促进钙沉积在血管壁复杂的动态过程涉及很多机制。血管钙化增加动脉僵硬降低弹性,这又会对血流动力学和心血管功能有影响。许多因素触发和促进钙化包括矿物质代谢异常,尤其是高磷血症和高钙血症,它可以刺激血管平滑肌细胞分化为成骨细胞表型^[9-10]。这是通过上调核心结合因子1 α (cbf α 1)/ α MSX-2和BMP2并且参与正常骨骼的发育,控制成骨蛋白的表达,这些蛋白包括骨钙素、骨粘连蛋白、碱性磷酸酶、胶原蛋白和骨唾液酸蛋白。另外一种导致血管钙化的机制是失去了钙化的抑制剂,比如胎球蛋白、MGP、焦磷酸和骨

桥蛋白^[1]。血管紧张素Ⅱ通过信号通路上调这些成骨蛋白。血管紧张素Ⅱ刺激骨形态蛋白2(BMP2)和骨形态蛋白4(BMP4)的表达^[2],同时刺激阳离子转运,比如 Ca^{2+} 和 Mg ^[2,13-14]。这些证据表明,血管紧张素Ⅱ的升高与血管钙化的风险增加密切相关。为了进一步了解血管紧张素Ⅱ促进钙化的机制,本研究探讨了血管紧张素Ⅱ在内皮细胞钙

化中的作用。

临床上具有高踝肱指数(ankle-brachial index, ABI)的患者其血浆血管紧张素Ⅱ的水平明显升高。此外,在体外血管紧张素Ⅱ加剧血管钙化^[15]。本研究显示,血管紧张素Ⅱ诱导HUVECs的BMP2、BMP4表达增加,氯沙坦减轻了由血管紧张素Ⅱ刺激的BMP2、BMP4表达增加,而且随时间的延长,血

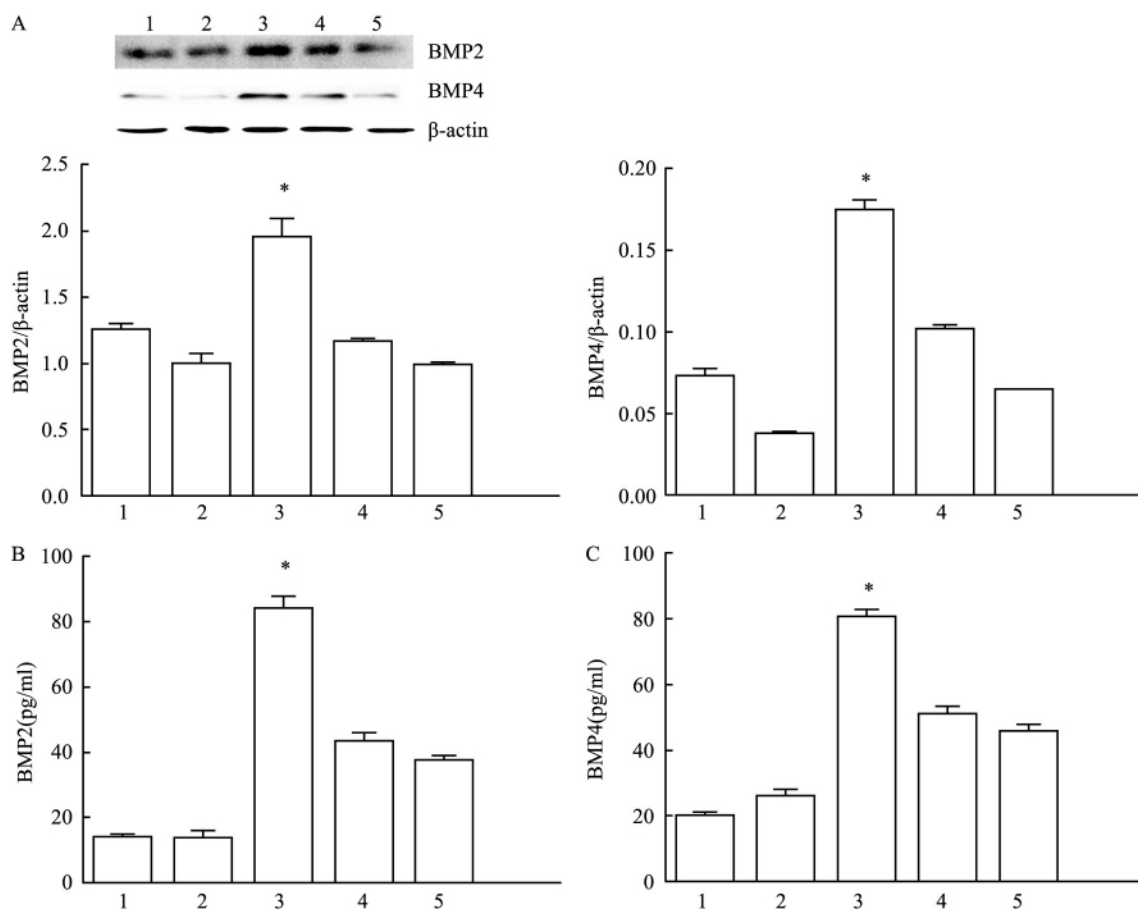


图1 Western blot 检测不同浓度梯度血管紧张素Ⅱ对内皮细胞 BMP2 和 BMP4 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2、3: 10、100 nmol/L 血管紧张素Ⅱ; 4、5: 1、10 μmol/L 血管紧张素Ⅱ; 与对照组比较: * $P < 0.05$

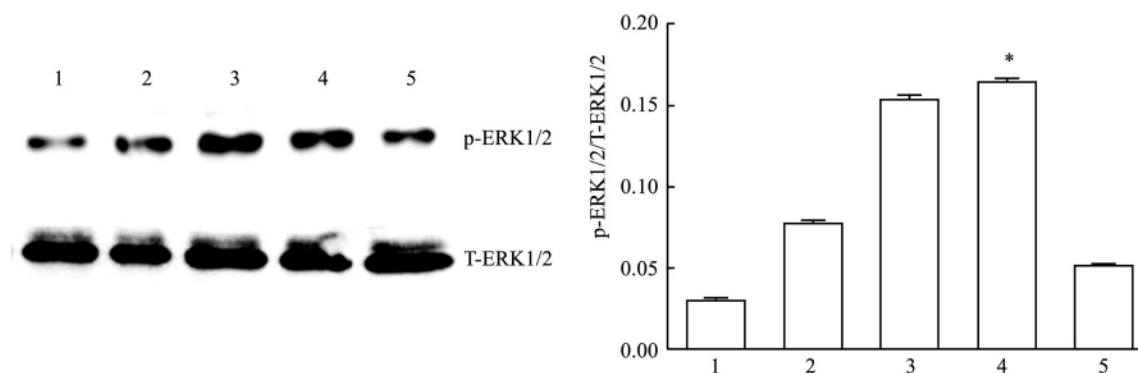


图2 Western blot 检测 ERK1/2 通路磷酸化水平

1: 0 min; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 45 min; 5: 60 min; 与对照组 0 min 比较: * $P < 0.05$

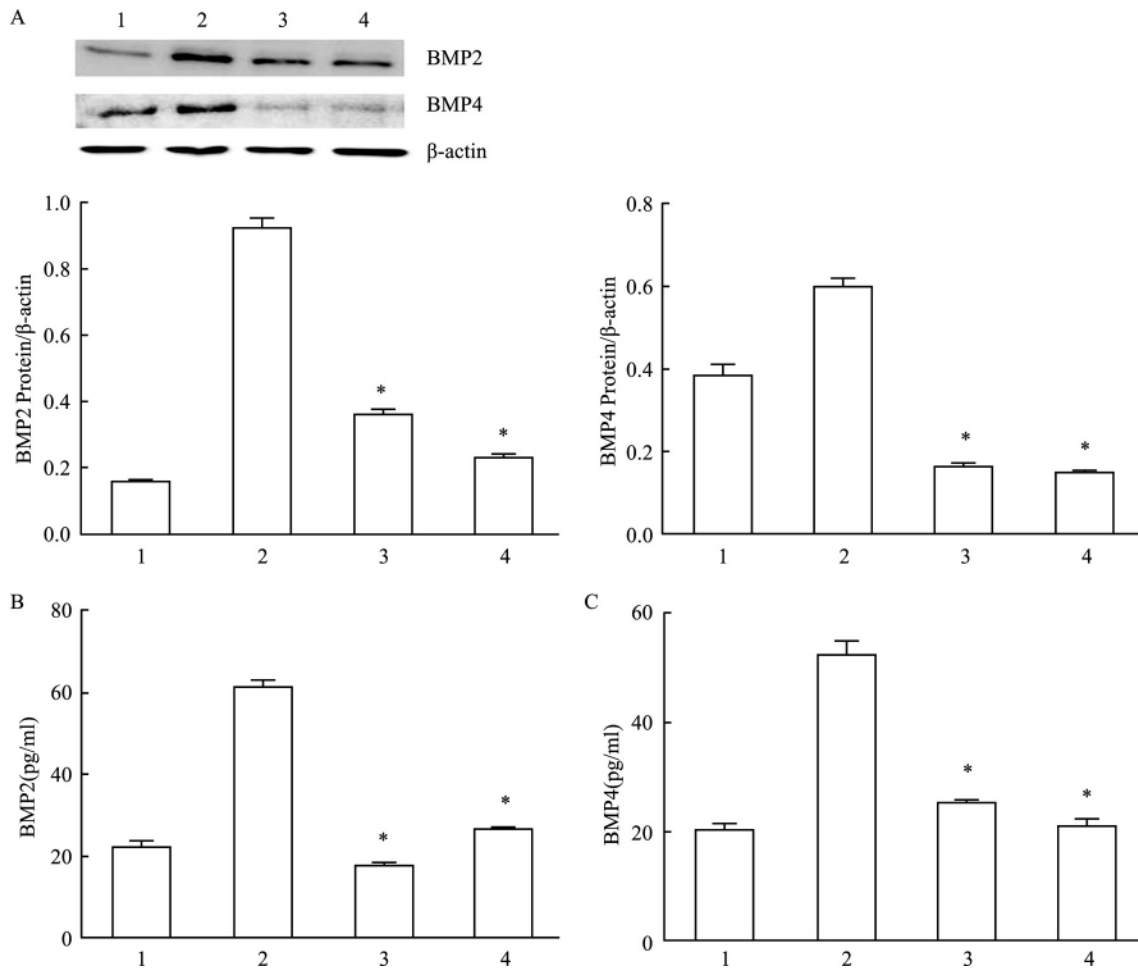


图3 Western blot 检测血管紧张素Ⅱ对钙化因子 BMP2、BMP4 的表达水平影响

1: 对照组; 2: 血管紧张素Ⅱ; 3: U0126 组; 4: 氯沙坦组; 与血管紧张素Ⅱ组比较: * $P < 0.05$

管紧张素Ⅱ刺激 HUVECs 在 45 min 左右其 ERK1/2 磷酸化达到最大,随后开始下降,此外 U0126 可以抑制 ERK1/2 的磷酸化,以上结果表明可能是通过抑制 ERK1/2 通路的激活减轻血管钙化。

血管紧张素Ⅱ通过各种途径引起动脉粥样硬化,比如内皮功能障碍、细胞增殖和炎症^[14]。而氯沙坦通过降压、抗炎的影响中和了血管紧张素Ⅱ的作用。氯沙坦通过抑制内皮细胞的钙化可以减轻血管钙化。有研究^[17-18]表明血管紧张素Ⅱ显著提高了 ERK 的磷酸化水平,且血管钙化的进展可能涉及 ERK1/2 通路的激活^[19],所以该研究选择探索 ERK1/2 通路可能参与了血管紧张素Ⅱ促进内皮细胞钙化的过程。氯沙坦通过下调 ERK1/2 的磷酸化水平降低血管紧张素诱导的内皮细胞钙化。本研究进一步发现 U0126 抑制 ERK1/2 可以下调成骨细胞标志物,下调 BMP2、BMP4 成骨型标志蛋白。这些证据表明 ERK1/2 通路可能参与血管紧张素Ⅱ促进钙化的过程。本研究还有一些不足,在体外血管紧

张素Ⅱ诱导内皮细胞钙化模型不能完全模仿体内钙化的条件。

本研究表明,在体外实验中血管紧张素Ⅱ可以加剧血管钙化。氯沙坦可以减轻血管紧张素Ⅱ促进钙化的进程,U0126 可以下调 ERK1/2 通路的磷酸化,并且减轻内皮细胞的钙化。这些研究结果提示氯沙坦可以作为血管钙化治疗的一个新靶点。

参考文献

- [1] Sage A P, Tintut Y, Demer L L. Regulatory mechanisms in vascular calcification [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7, 9, 528-36.
- [2] Renneberg R J, Kessels A G, Schurgers L J, et al. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis [J]. Vasc Health Risk Manag, 2009, 5(1): 185-97.
- [3] Anand D V, Lim E, Darko D, et al. Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes: role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(23): 2218-25.
- [4] Johnson R C, Leopold J A, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications [J]. Circ

- Res, 2006,99(10):1044–59.
- [5] Hruska K A, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2005, 97(2):105–14.
 - [6] Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer C A, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999,19(7):1623–9.
 - [7] Morawietz H, Erbs S, Holtz J, et al. Endothelial protection, AT1 blockade and cholesterol-dependent oxidative stress: the EPAS trial [J]. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl):I296–301.
 - [8] Savoia C, Burger D, Nishigaki N, et al. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011,13:e11.
 - [9] Li X, Giachelli C M. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007,16(4):325–8.
 - [10] Li X, Yang H Y, Giachelli C M. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2008,199(2):271–7.
 - [11] Scatena M, Liaw L, Giachelli C M. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007,27(11):2302–9.
 - [12] Osako M K, Nakagami H, Shimamura M, et al. Cross-talk of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand signaling with renin-angiotensin system in vascular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013,33(6):1287–96.
 - [13] Shammash R M, Ranganath V K, Paulus H E. Remission in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2010,12(5):355–62.
 - [14] He Y, Yao G, Savoia C, et al. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II [J]. *Circ Res*, 2005,96(2):207–15.
 - [15] Montezano A C, Nguyen Dinh Cat A, Rios F J, et al. Angiotensin II and vascular injury [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2014,16(6):431.
 - [16] Ferrario C M, Strawn W B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol*, 2006,98(1):121–8.
 - [17] Zhang Y, Naggar J C, Welzig C M, et al. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009,29(11):1764–71.
 - [18] Bruder-Nascimento T, Chinnasamy P, Riascos-Bernal D F, et al. Angiotensin II induces Fat1 expression/activation and vascular smooth muscle cell migration via Nox1-dependent reactive oxygen species generation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014,66:18–26.
 - [19] Huang J, Huang H, Wu M, et al. Connective tissue growth factor induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through ERK signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2013,32(2):423–9.

The mechanism of angiotensin II regulates the calcification in HUVECs through ERK1/2 pathway

Cheng Zhiyuan¹, Ye Ting², Ling Qiuyang², et al

(¹Dept of Cardiology, Wuxi Clinical Hospital, Anhui Medical University, Wuxi 214044;

²Dept of Cardiology, 101 Hospital of PLA, Wuxi 214044)

Abstract Objective To investigate the pathophysiological mechanism of angiotensin II promoting vascular calcification through ERK1/2 pathway. **Methods** After cultured for 5 days *in vitro*, endothelial cells were stimulated with different concentrations of angiotensin II, and the optimal concentration of angiotensin II for inducing calcification of vascular endothelial cells was screened out. The cells were randomly divided into four groups and treated with angiotensin II (Ang II) according to the following: Control, Ang II (100 nmol/L), Ang II + U0126 (Ang II 100 nmol/L + U0126 1 μ mol/L), Ang II + Losartan (Ang II 100 nmol/L + Losartan 1 μ mol/L). The expression of BMP2 and BMP4 was detected by Western blot and ELISA to explore the effect of angiotensin II on vascular endothelial calcification and its signal pathway. **Results** Ang II treatment of HUVECs led to significant up-regulation of BMP2 and BMP4 expression and activation. Neither the BMP2 or BMP4 proteins, nor the secreted proteins were detectable in the control group or Losartan treated group or U0126 treated group; however, there was a significant increase in Ang II-treated group ($P < 0.05$). The BMP2 and BMP4 proteins were not expressed in the control or Losartan treated groups or others, whereas in Ang II-treated cells both BMP2 and BMP4 proteins expression were enhanced ($P < 0.05$). The effect of Ang II could be inhibited by the addition of Losartan ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang II promotes calcification of HUVECs through ERK1/2 pathway, which lead to pathological vascular calcification.

Key words angiotensin II; human umbilical vein cord endothelial cell; calcification; ERK1/2 signal pathway