

本文引用: 李朝荃, 姚慧, 刘婉婷, 等. S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 减轻 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞线粒体损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(6): 481-492. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.06.004.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-06-0481-12

· 实验研究 ·

S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 减轻 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞线粒体损伤

李朝荃¹, 姚慧¹, 刘婉婷², 谢玉鑫², 杨皓天¹, 付傲妮¹, 李婧³, 易光辉^{1,3}

1. 南华大学基础医学院心血管病研究所, 2. 南华大学药学院药理学教研室, 3. 南华大学基础医学院, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探讨 1-磷酸鞘氨醇(S1P)是否通过 1-磷酸鞘氨醇受体(S1PR)/富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2(Pyk2)通路调控线粒体钙单向转运体(MCU)表达,从而减少氧化应激诱导的线粒体损伤并抑制线粒体相关凋亡。**[方法]** 采用过氧化氢(H₂O₂)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化损伤模型,并使用不同浓度的 S1P 处理氧化损伤的 HUVEC。同时,实验中应用 S1PR1 激动剂 SEW2871、S1PR1 抑制剂 W146 及 Pyk2 抑制剂 PF-562271,以探讨 S1P 作用的具体机制。**[结果]** S1P 处理后,HUVEC 受到的氧化损伤明显缓解($P<0.01$),并伴随 S1PR1 表达的增加($P<0.05$),而 S1PR3 的表达无显著变化。同时,Pyk2 和 MCU 的表达水平下降($P<0.05$)。SEW2871 进一步降低线粒体损伤($P<0.05$),而 W146 则使损伤加重($P<0.05$)。此外,Pyk2 抑制剂 PF-562271 的应用同样降低了 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤($P<0.05$),进一步验证了 Pyk2 在该过程中发挥的作用。**[结论]** S1P 通过 S1PR1 抑制 Pyk2 的表达,从而减少 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体损伤并抑制线粒体相关凋亡。**[关键词]** 1-磷酸鞘氨醇; 富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2; 氧化应激; 人脐静脉内皮细胞; 线粒体损伤**[中图分类号]** R363;R5 **[文献标识码]** A

S1P/S1PR1 attenuates H₂O₂-induced mitochondrial damage in vascular endothelial cells by inhibiting Pyk2

LI Chaoquan¹, YAO Hui¹, LIU Wanting², XIE Yuxin², YANG Haotian¹, FU Aoni¹, LI Jing³, YI Guanghui^{1,3}

1. Institute of Cardiovascular Disease, School of Basic Medical Sciences, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. School of Basic Medical Sciences, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether sphingosine-1-phosphate (S1P) regulates the expression of mitochondrial calcium uniporter (MCU) via the sphingosine-1-phosphate receptor/proline-rich tyrosine kinase 2 (S1PR/Pyk2) signaling pathway, thereby reducing oxidative stress-induced mitochondrial damage and inhibiting mitochondria-related apoptosis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were subjected to oxidative damage using hydrogen peroxide (H₂O₂) as a model. Different concentrations of S1P were applied to the oxidatively damaged HUVEC. Additionally, the S1PR1 agonist SEW2871, the S1PR1 inhibitor W146, and the Pyk2 inhibitor PF-562271 were used to explore the specific mechanism of S1P action. **Results** S1P treatment significantly alleviated oxidative damage in HUVEC and was accompanied by an increase in S1PR1 expression ($P<0.05$), while S1PR3 expression remained unchanged. Meanwhile, the expression levels of Pyk2 and MCU decreased ($P<0.05$). SEW2871 further reduced mitochondrial damage, whereas W146 exacerbated it ($P<0.05$). Furthermore, the application of the Pyk2 inhibitor PF-562271 also reduced H₂O₂-induced mitochondrial damage ($P<0.05$), further confirming the role of Pyk2 in this process. **Conclusion** S1P reduces H₂O₂-induced mitochondrial damage and inhibits mitochondria-related apoptosis in HUVEC by suppressing Pyk2 expression via S1PR1.

[收稿日期] 2025-02-25

[修回日期] 2025-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770490);湖南省科技计划项目(2020JJ4535)

[作者简介] 李朝荃, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化与心肌缺血损伤病因发病学与防治研究, E-mail: 923270775@qq.com。通信作者易光辉, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化与心肌缺血损伤病因发病学与防治研究, E-mail: 1984001973@usc.edu.cn。

[KEY WORDS] sphingosine-1-phosphate; proline-rich tyrosine kinase 2; oxidative stress; human umbilical vein endothelial cell; mitochondrial damage

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是常见的心血管疾病,每年导致全球约1 760万人死亡,预防与治疗至关重要^[1]。As的发生涉及内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞等^[2-3]。内皮细胞受损时,脂质在血管壁沉积,平滑肌细胞增殖、迁移,单核细胞分化为巨噬细胞,吞噬脂质形成泡沫细胞,进而释放炎症因子,加剧炎症并导致细胞死亡。研究表明,As过程中存在多种内皮细胞死亡方式,包括自噬性细胞死亡、凋亡、焦亡、中性粒细胞胞外诱捕网、程序性坏死和铁死亡^[4]。其中,凋亡是受基因调控的细胞死亡形式,避免细胞内容物释放,维持生理稳态。内皮细胞过度凋亡是As发生的重要早期事件,可能成为防治靶点^[5]。氧化应激、慢性炎症等均可引起内皮损伤^[6],其中氧化应激通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)破坏细胞功能,导致线粒体损伤并激活凋亡信号通路^[7-8]。

线粒体在ATP生成、氧化还原平衡、炎症调节和细胞死亡中发挥重要作用^[9]。氧化应激可导致线粒体病变,ROS过量积累诱导细胞凋亡^[10]。内皮功能障碍表现为内皮依赖性血管舒张受损和细胞凋亡增加。因此,氧化应激诱导线粒体功能障碍,而线粒体在调节细胞凋亡过程中起关键作用^[11]。此外,线粒体在Ca²⁺平衡中起关键作用,Ca²⁺过载可降低线粒体膜电位,增加线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的开启并诱导凋亡^[12-13]。富含脯氨酸的酪氨酸激酶2(proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2)作为非受体酪氨酸激酶,可磷酸化线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU),促进Ca²⁺摄取,从而调节线粒体功能。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种重要的生物活性磷脂信号分子,在免疫调节、炎症反应、血管生成、细胞存活和迁移等过程中发挥关键作用。S1P主要由鞘氨醇在鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SphK)催化下磷酸化生成,并可通过S1P磷酸酶脱磷酸化为鞘氨醇,或经S1P裂解酶降解为非鞘脂代谢物。S1P可作为细胞内第二信使直接参与信号转导,也可通过与S1P受体(sphingosine-1-phosphate receptor, S1PR)家族结合,激活G蛋白偶联受体信号通路,调控细胞功能^[14-15]。S1P主要由血液中的红细胞和血小板分泌,形成S1P浓

度梯度,在免疫细胞迁移、血管稳态、神经保护及炎症反应中发挥重要作用,其紊乱与癌症、自身免疫疾病、心血管疾病等多种病理状态密切相关。但其保护血管内皮的具体机制尚不明确。因此,本研究采用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)建立氧化应激模型,并探讨S1P是否通过S1PR1/Pyk2通路调控MCU表达,从而减少氧化应激诱导的线粒体损伤,并抑制线粒体相关凋亡。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HUVEC购自中国科学院细胞研究所;DMEM高糖培养基和胎牛血清购自美国GIBCO公司;CCK-8粉末购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;SEW2871粉末和PF-562271购自美国MCE公司;S1P粉末购自美国Sigma公司;W146购自中国MedChemExpress公司;S1PR1、S1PR3抗体购自美国Novusbio公司;Pyk2抗体和MCU抗体购自美国Abcam公司;Bcl-2抗体、Bax抗体、Caspase-3抗体、 β -actin抗体、二抗山羊抗兔抗体和二抗山羊抗鼠抗体购自美国Proteintech公司;T25细胞培养瓶、T75细胞培养瓶购自美国NEST公司。

1.2 HUVEC培养与处理

在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养HUVEC,待细胞生长到80%~90%,进行分瓶传代操作。实验试剂H₂O₂、S1P、W146、SEW2871、PF-562271添加顺序及处理时间为:W146、SEW2871和PF-562271预先处理细胞30min,然后S1P处理细胞3h,最后是H₂O₂处理2h。实验共分为三步。第一步:将细胞分为对照组(Control)、H₂O₂组(400 μ mol/L H₂O₂处理)和H₂O₂+S1P处理组(400 μ mol/L H₂O₂和6.4 μ mol/L S1P处理),探究S1P是否改善H₂O₂诱导的HUVEC线粒体损伤。第二步:将细胞分为对照组(Control)、H₂O₂组、H₂O₂+S1P处理组、S1P+S1PR1激动剂组(6.4 μ mol/L S1P和10 μ mol/L SEW2871处理)和S1P+S1PR1抑制剂组(6.4 μ mol/L S1P和3 μ mol/L W146处理),探究S1P通过S1PR1/3改善H₂O₂诱导的HUVEC线粒体损伤。第三步:将细胞分为对照组(Control)、H₂O₂组、H₂O₂+S1P处理组(400 μ mol/L H₂O₂和6.4 μ mol/L S1P处理)和S1P+Pyk2抑制剂组(6.4 μ mol/L S1P

和 5 $\mu\text{mol/L}$ PF-562271 处理),探究 S1P 是否通过 S1PR1/Pyk2 改善 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体损伤。

1.3 CCK-8 细胞活力检测

用胰酶消化贴壁的 HUVEC,加入培养基制备细胞悬液,并采用标准方法计数。将 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液接种到 96 孔板中,每孔加入 100 μL 培养基。空白组和对照组均设置 5 个重复孔。96 孔板放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,以便细胞黏附。根据实验需求准备培养基,加入 CCK-8 试剂 (10 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ 培养基)。孵育 2 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值,以评估细胞活性。

1.4 Western blot 实验检测蛋白表达

细胞去除培养液并用预冷 PBS 清洗 3 次,彻底吸干残液后配制含 RIPA、PMSF、蛋白酶及磷酸酶抑制剂的裂解液(比例为 94:6:1:1),滴加至培养瓶中进行裂解(冰上 30 min)。细胞刮取后离心,收集上清。蛋白定量采用 BCA 法,构建标准曲线后测定 OD 值(560 nm),按最低样品 OD 值配平各样本蛋白浓度,加入 5 \times Loading buffer (1:4 比例),煮沸 10 min 变性,冷却后置于 -20°C 保存。使用 SDS-PAGE 制备适宜浓度的分离胶及浓缩胶,在 37°C 水箱分别孵育 30 min,加载样本及预染蛋白 Marker,依次以 80 V 30 min、120 V 60 min 进行电泳。蛋白电泳结束后,PVDF 膜先用甲醇活化,转膜夹中依次组装海绵、滤纸、胶、PVDF 膜等,组装后放入转膜槽,200 mA 恒流转膜 2 h (4°C)。膜经 TBST 清洗后以 5% 脱脂奶粉封闭 2~4 h 或 4°C 过夜,随后分别加入稀释后的一抗(如 S1PR1 1:1 000, β -actin 1:10 000 等), 4°C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,继而加入 HRP 标记二抗(1:10 000),室温孵育 1~2 h,再次洗膜 3 次。最后,使用显影液按 1:1 比例混合,避光孵育膜后通过化学发光成像系统曝光,条带灰度值由 Image J 软件分析。

1.5 透射电子显微镜观察线粒体超微结构

细胞处理后,用细胞刮刀刮取每组细胞, 4°C 下以 2 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。缓慢沿管壁加入预冷的 2.5% 戊二醛固定细胞, 4°C 存放过夜。细胞沉淀用 1 \times PBS 洗涤 3 次,每次 15 min。用 1% 四氧化铈在 4°C 下固定 1~2 h,再用 PBS 洗涤 3 次。细胞样品通过梯度浓度乙醇(30%~100%)脱水,每步 15~20 min,最后用无水丙酮处理 20 min。将样品在丙酮与包埋介质混合物中处理 4 h,随后在纯包埋介质中过夜。样品切割成 70~90 nm 厚的切片,用铅柠檬酸盐和乙酸铈染色 5~10 min。最终,使用透射电子显微镜观察线粒体的超微结构。

1.6 DHE 荧光探针检测 ROS

二氢乙啶(DHE)预先溶解在二甲基亚砜(DMSO)中,制备成 5 mmol/L 的储备液并避光保存在 -20°C 。使用前,将储备液稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$ 。用胰酶消化贴壁细胞,制备细胞悬液并计数。适量细胞悬液接种到 48 孔板中,每孔 200 μL 培养基,每组设 3 个复孔。24 h 培养后进行实验处理。在暗环境下,将 5 mmol/L 储备液稀释为 20 $\mu\text{mol/L}$ DHE 工作液。将 48 孔板取出,细胞用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。随后,用 20 $\mu\text{mol/L}$ DHE 工作液替换培养基, 37°C 水浴暗箱中孵育 40 min。孵育结束后,吸去工作液,用 PBS 洗涤细胞 3 次。最后,使用荧光显微镜拍摄图像,并使用 Image J 软件进行荧光结果的定量分析。

1.7 Rhod-2 AM 检测线粒体 Ca^{2+}

Rhod-2 AM 溶解在无水 DMSO 中,制备 1 mmol/L 的储备液,存储在 -20°C 干燥、避光的地方。用胰酶消化贴壁细胞,制备细胞悬液并计数。适量细胞悬液接种到 48 孔板中,每孔 200 μL 培养基,每组设 3 个复孔。24 h 培养后进行实验处理。在暗环境下,将 Rhod-2 AM 储备液稀释至 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。吸去培养基后,用 HHBS 缓冲液洗涤细胞 2 次。然后向每孔加入 100 μL Rhod-2 AM 工作液,将培养板置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中孵育 30 min。孵育结束后,吸去工作液,洗涤细胞 2 次,最终使用荧光显微镜拍摄图像并保存。

1.8 JC-1 检测线粒体膜电位

JC-1 避光处理并储存于 -20°C 。经过层流罩消毒后,用胰酶消化 HUVEC,制备细胞悬液并计数。适量细胞悬液接种到 48 孔板中,每孔 200 μL 培养基,每组设置 3 个复孔。24 h 培养后,吸去培养基,用 PBS 洗涤 1 次。向每孔加入 100 μL JC-1 工作液, 37°C 、5% CO_2 孵育 30 min。孵育结束后,吸去培养基,用 1 \times Incubation Buffer 洗涤细胞 2 次,最后加培养基,使用荧光显微镜拍摄图像。

1.9 流式细胞术检测线粒体膜电位

HUVEC 用胰酶消化,制备细胞悬液。将细胞接种到 6 孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,培养 24 h 以便黏附。根据实验条件处理细胞,吸去培养基,用 PBS 洗涤一次。加入 500 μL 胰酶消化细胞,待细胞变圆后立即终止消化。轻轻吸取并离心,弃去上清液,加入 JC-1 工作液,重新悬浮细胞,均匀分布。细胞在暗环境中孵育 30 min。孵育结束后,收集工作液,离心并弃去上清液,用 1 \times Incubation Buffer 洗涤 1

次,最终重悬于 200 μL 缓冲液中,使用流式细胞仪进行分析。

1.10 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔

Calcein AM 避光处理并储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。HUVEC 用胰酶消化,制备细胞悬液并计数。适量细胞悬液接种到 48 孔板中,每孔 200 μL 培养基,每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后,吸去培养基并用 PBS 洗涤 1 次。在暗环境下,向每孔加入 200 μL Calcein AM 工作液,轻轻摇晃以确保染料均匀覆盖细胞。样品在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 20 min。孵育结束后,吸去工作液,加入预热的无血清培养基并继续孵育 30 min。最后,弃培养基,细胞用 PBS 洗涤 2 次,加入检测缓冲液,使用荧光显微镜拍摄图像。

1.11 统计学分析

所有进行统计学处理的实验结果均取自 3 次独立重复实验。实验数据使用 Image J 软件处理,并通过 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异比较采用单因素方差分析和 q 检验, $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 S1P 缓解 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体损伤

2.1.1 S1P 对 HUVEC 细胞活力、ROS 水平和细胞凋亡的影响 为了探究 S1P 是否在 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体损伤中发挥作用,本研究采用 CCK-8 法检测不同浓度 S1P 处理正常 HUVEC 后的细胞活力,以及不同浓度 S1P 处理 H_2O_2 诱导的 HUVEC 损伤后的细胞活力。结果发现,0.2 ~ 12.8 $\mu\text{mol/L}$ S1P 对正常 HUVEC 没有损伤作用,6.4 $\mu\text{mol/L}$ S1P 显著抑制 H_2O_2 对 HUVEC 活力的损伤作用,其细胞活力较 H_2O_2 组提高 38.6% ($P<0.01$;图 1A 和图 1B)。同时,使用 DHE 荧光探针检测 ROS 水平。与对照组相比,加入 H_2O_2 后,红色荧光增强,ROS 水平升高 6.6 倍 ($P<0.01$);而加入 S1P 后,与 H_2O_2 组相比,红色荧光减弱,ROS 水平降低 31.3% ($P<0.05$;图 1C)。Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。结果发现,与对照组相比,加入 H_2O_2 后凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 表达增加 40.6% 和 22.7% ($P<0.01$),Bcl-2 表达降低 31.6% ($P<0.05$);而 S1P 抑制了 H_2O_2 诱导的 HUVEC 凋亡。同时,结果显示,与对照组相比,加入 H_2O_2 后,S1PR1 表达降低 65.4% ($P<0.01$),Pyk2 和 MCU 表达增加 41.2% 和 34.3% ($P<0.05$);而加入 S1P 后,相

比于 H_2O_2 组,S1PR1 表达增加 47.9% ($P<0.05$),Pyk2 和 MCU 表达降低 6.4% 和 9.9% ($P<0.05$),而 S1PR3 表达差异无显著性(图 1D)。说明 S1P 减轻上述线粒体损伤以及损伤引起的 ROS 变化和细胞凋亡,可能与 S1PR1、Pyk2 和 MCU 有关。

2.1.2 S1P 缓解 HUVEC 线粒体结构和功能损伤

透射电镜观察线粒体的超微结构,结果显示,与对照组相比,加入 H_2O_2 后线粒体肿胀,体积增大,线粒体嵴减少,而 S1P 减轻了上述线粒体损伤(图 2A)。在线粒体功能上,本研究使用 Rhod-2 AM 荧光探针检测线粒体 Ca^{2+} 水平。与对照组相比,加入 H_2O_2 后,线粒体 Ca^{2+} 水平升高 3.96 倍 ($P<0.01$);加入 S1P 后,线粒体 Ca^{2+} 水平较 H_2O_2 组降低 24.1% ($P<0.01$;图 2B)。接着,使用 JC-1 荧光探针以及流式细胞术检测了线粒体膜电位水平的变化,正常健康的线粒体膜电位中 JC-1 以多聚体形式存在,发射光为红色荧光,当细胞发生凋亡时,JC-1 以单体形式存在于胞质中,发射光为绿色荧光。与对照组相比,加入 H_2O_2 后,红色荧光减弱,绿色荧光增强,线粒体膜电位水平降低 35.9% ($P<0.01$);而加入 S1P 后,红色荧光增强,绿色荧光减弱,线粒体膜电位水平相对 H_2O_2 组升高 26.2% ($P<0.05$;图 2C)。流式细胞术结果与荧光结果一致(图 2D)。接下来使用 Calcein AM 荧光探针检测了线粒体通透性转换孔的变化。与对照组相比,加入 H_2O_2 后,绿色荧光减弱,线粒体通透性转换孔的开放程度增加 50.9% ($P<0.01$),而加入 S1P 后,绿色荧光增强,线粒体通透性转换孔开放程度相对 H_2O_2 组减弱 42.5% ($P<0.01$;图 2E)。

2.2 S1P 通过 S1PR1 缓解 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体损伤

2.2.1 S1P 通过 S1PR1 降低 HUVEC 的 ROS 水平并抑制细胞凋亡 与对照组相比,加入 H_2O_2 后,红色荧光增强,ROS 水平升高 3.9 倍 ($P<0.01$);而加入 S1P 后 ROS 水平与 H_2O_2 处理组相比降低了 19.0% ($P<0.01$);与 H_2O_2 +S1P 组相比, H_2O_2 +S1P+SEW2871 组 ROS 水平进一步降低了 23.5% ($P<0.01$),而 H_2O_2 +S1P+W146 组 ROS 水平增加了 13.7% ($P<0.05$;图 3A)。Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达,结果发现,与对照组相比,加入 H_2O_2 后凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达增加 55.4% 和 56.0% ($P<0.01$),Bcl-2 表达降低 41.5% ($P<0.01$);与 H_2O_2 组相比,

加入 S1P 后, Bax 表达降低 12.7% ($P < 0.05$), Caspase-3 表达降低 16.9% ($P < 0.01$), Bcl-2 表达增加 39.9% ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, H_2O_2 +S1P+SEW2871 组凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达降低 18.9% 和 20.1% ($P < 0.05$), Bcl-2 表达增加 14.4% ($P < 0.01$), 而 H_2O_2 +S1P+W146 组 Bax 和 Caspase-3 表达增加 8.8% 和 10.2% ($P < 0.05$), Bcl-2 表达降低 9.6% ($P < 0.05$)。同时, 与对照组相比, 加入 H_2O_2 后, S1PR1 表达降低 39.8% ($P < 0.01$),

Pyk2、MCU 表达增加 73.8% 和 38.0% ($P < 0.01$); 而加入 S1P 后, S1PR1 表达增加 23.5% ($P < 0.05$), Pyk2、MCU 表达降低 15.7% 和 12.5% ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, 加入 SEW2871 后, S1PR1 表达升高 22.6% ($P < 0.05$), Pyk2 和 MCU 表达降低 14.2% 和 13.7% ($P < 0.05$), 而加入 W146 后, 趋势相反(图 3B)。说明 S1P 通过 S1PR1 减轻上述线粒体损伤以及损伤引起的 ROS 变化和细胞凋亡, 并且可能与 Pyk2、MCU 有关。

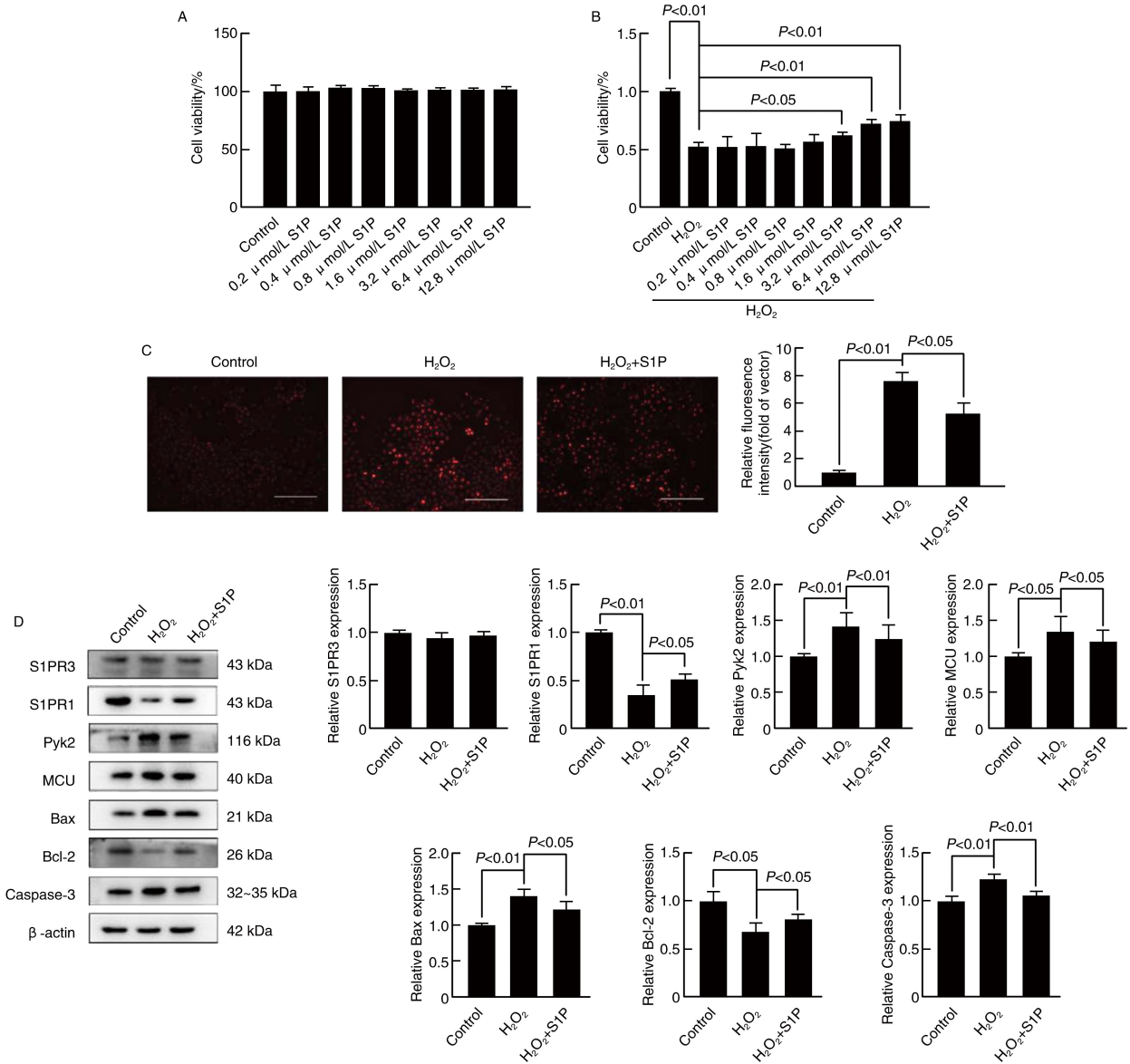


图 1. S1P 对 HUVEC 细胞活力、ROS 水平和细胞凋亡的影响

A 为不同浓度 S1P 对正常细胞活力的影响。B 为不同浓度 S1P 对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 细胞活力的影响。C 为 DHE 检测 ROS 水平(Bar=300 μm)及定量结果。D 为 Western blot 检测 S1PR3、S1PR1、Pyk2、MCU、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达及定量结果。

Figure 1. Effects of S1P on HUVEC cell viability, ROS levels and apoptosis

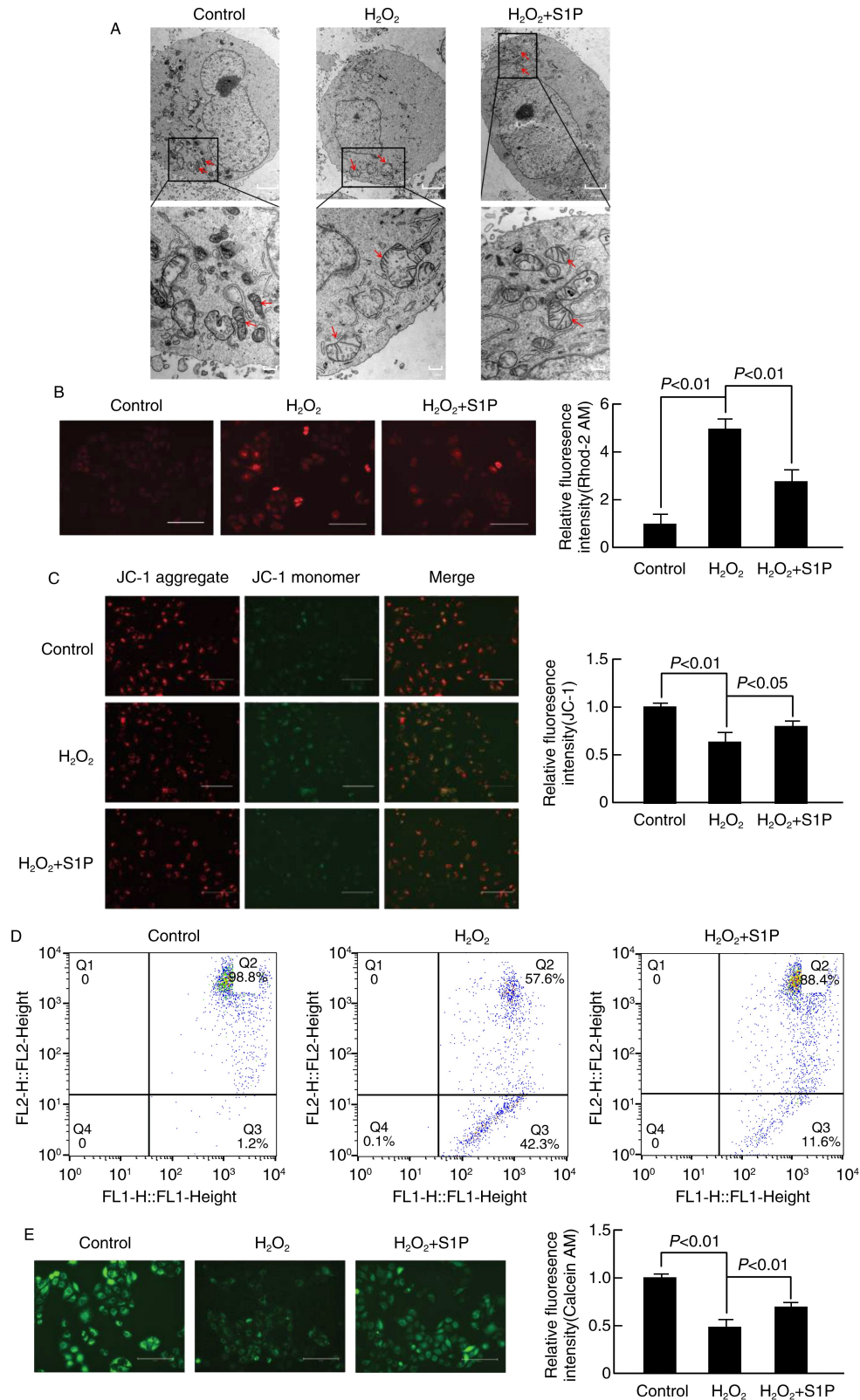


图 2. SIP 缓解 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体结构和功能损伤

A 为透射电镜观察 SIP 处理后 H₂O₂ 诱导 HUVEC 后的线粒体形态结构, 上方插图表示线粒体 (Bar=25 μm), 下方为放大图像 (Bar=5 μm), 红色箭头指示线粒体。B 为 Rhod-2 AM 检测线粒体 Ca²⁺ 水平 (Bar=300 μm) 及定量分析。

C 为 JC-1 检测线粒体膜电位 (Bar=150 μm) 及定量分析。D 为流式细胞术检测线粒体膜电位。

E 为 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔的开放程度 (Bar=150 μm) 及定量分析。

Figure 2. SIP alleviates H₂O₂-induced mitochondrial structural and functional damage in HUVEC

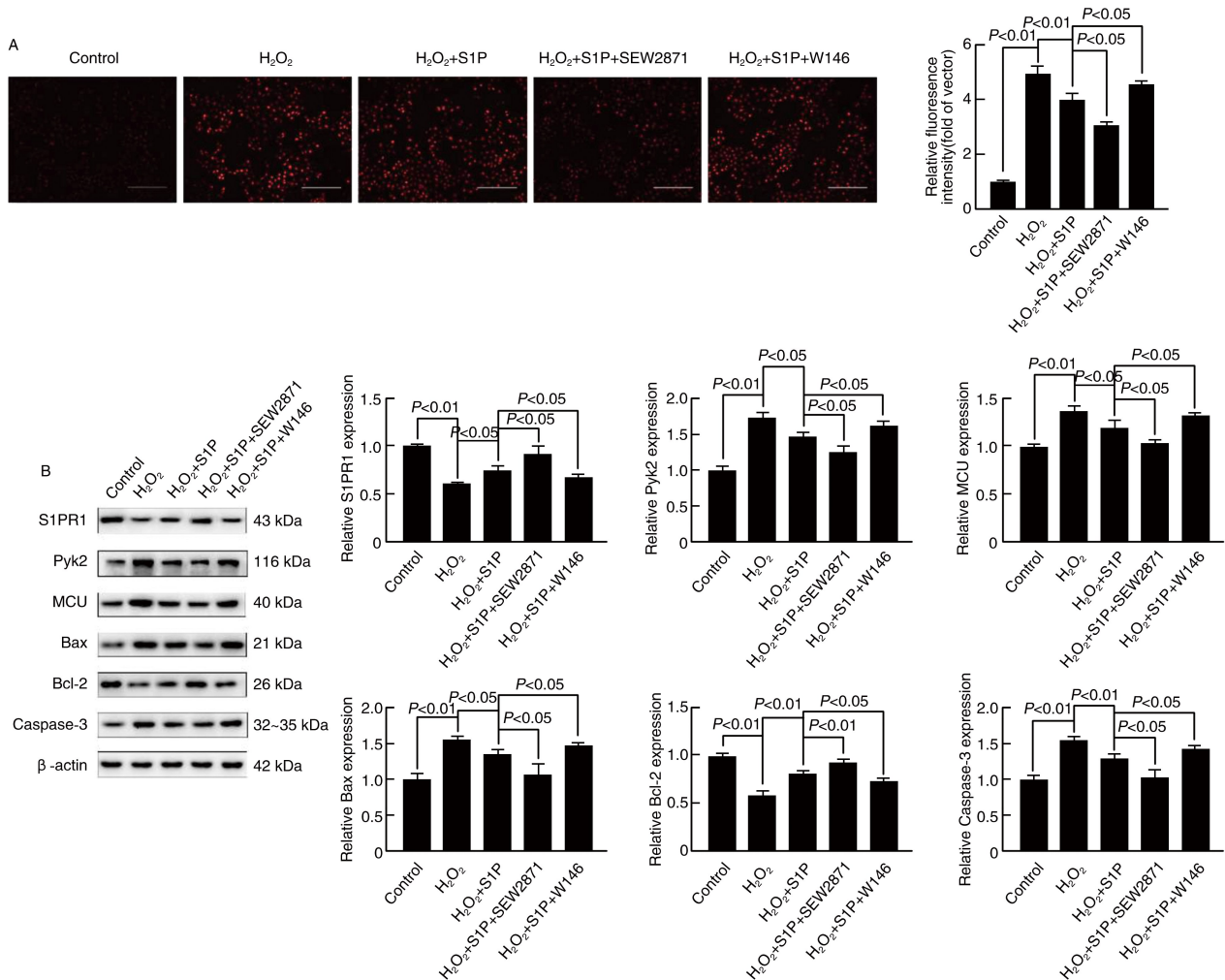


图 3. S1P 通过 S1PR1 降低 HUVEC 的 ROS 水平并抑制细胞凋亡

A 为 DHE 检测 ROS 水平 (Bar=300 μm) 及定量分析 (n=3)。B 为 Western blot 检测 S1PR1、Pyk2、MCU、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达及定量分析。

Figure 3. S1P reduces ROS levels and inhibits apoptosis in HUVEC through S1PR1

2.2.2 S1P 通过 S1PR1 缓解线粒体结构和功能的损伤 为了进一步确定 S1P 是否通过 S1PR1 影响 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体损伤,本研究使用 S1PR1 特异性激动剂 SEW2871 和 S1PR1 特异性抑制剂 W146 处理 HUVEC,通过透射电镜观察线粒体形态结构。结果显示,与对照组相比,加入 H₂O₂ 后线粒体肿胀,体积增大,线粒体嵴减少,甚至线粒体膜破裂,加入 S1P 后上述线粒体形态结构损伤减轻。与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+SEW2871 组上述线粒体形态结构损伤减轻,而 H₂O₂+S1P+W146 组上述线粒体形态结构损伤加重 (图 4A)。

在线粒体功能方面,与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,线粒体 Ca²⁺ 水平升高 4.7 倍 (P<0.01);加入 S1P 后,线粒体 Ca²⁺ 水平相比于 H₂O₂ 组下降 55.2% (P<0.01);与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+

SEW2871 组线粒体 Ca²⁺ 水平降低 37.3% (P<0.01),而 H₂O₂+S1P+W146 组线粒体 Ca²⁺ 水平升高 73.3% (P<0.01;图 4B)。同样地,与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,红色荧光减弱,绿色荧光增强,线粒体膜电位水平降低 51.5% (P<0.01);而加入 S1P 后,红色荧光增强,绿色荧光减弱,线粒体膜电位水平升高 38.6% (P<0.01);与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+SEW2871 组线粒体膜电位水平升高 20.5% (P<0.05),而 H₂O₂+S1P+W146 组线粒体膜电位水平降低 16.1% (P<0.05;图 4C)。流式细胞术结果与荧光结果一致 (图 4D)。线粒体通透性转换孔的变化上,与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,绿色荧光减弱,线粒体通透性转换孔开放程度增加 49.3% (P<0.01);而加入 S1P 后,相比于 H₂O₂ 组,绿色荧光增强,线粒体通透性转换孔开放程度减弱

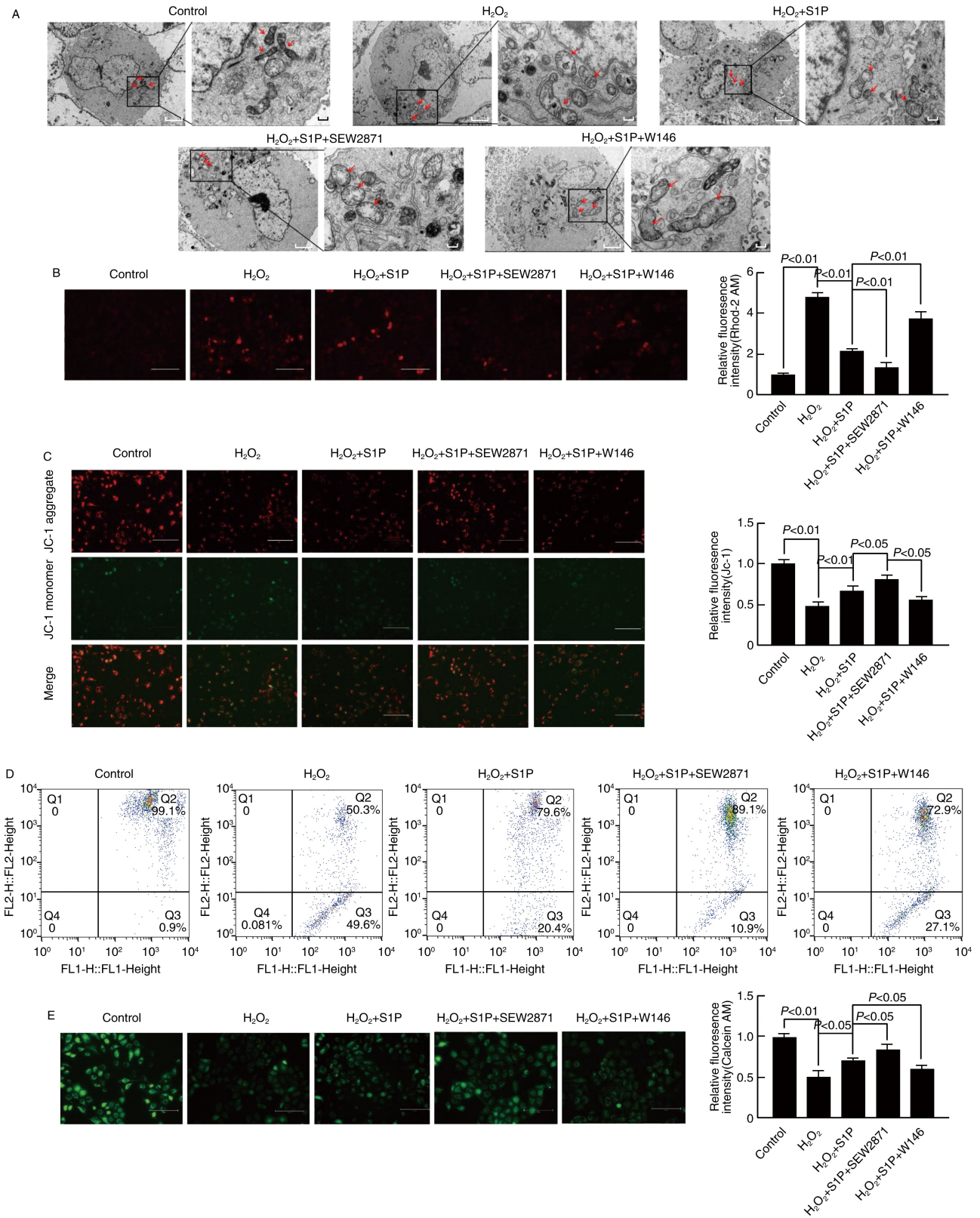


图 4. S1P 通过 S1PR1 缓解线粒体结构和功能的损伤

A 为透射电镜观察 S1P 处理后 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体形态结构, 每组图的左图表示线粒体 (Bar=25 μm), 右图为放大图像 (Bar=5 μm), 红色箭头指示线粒体。B 为 Rhod-2 AM 检测线粒体 Ca²⁺ 水平 (Bar=300 μm) 及定量分析。

C 为 JC-1 检测线粒体膜电位 (Bar=150 μm) 及定量分析。D 为流式细胞术检测线粒体膜电位。

E 为 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔的开放程度 (Bar=150 μm) 及定量分析。

Figure 4. S1P alleviates mitochondrial structural and functional damage through S1PR1

39.4% ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, H_2O_2 +S1P+SEW2871 组线粒体通透性转换孔开放程度减弱 20.4% ($P < 0.05$), 而 H_2O_2 +S1P+W146 组线粒体通透性转换孔开放程度增强 14.3% ($P < 0.05$; 图 4E)。

2.3 S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 缓解 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体损伤

2.3.1 S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 降低 HUVEC 的 ROS 水平并抑制细胞凋亡 DHE 荧光探针检测 ROS 水平, 与对照组相比, 加入 H_2O_2 后, 红色荧光增强, ROS 水平升高 3.2 倍 ($P < 0.01$); 而加入 S1P 后, 红色荧光减弱, ROS 水平相比于 H_2O_2 组降低 25.3% ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, H_2O_2 +S1P+PF-562271 组 ROS 水平降低 47.8% ($P < 0.01$; 图 5A)。接下来, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。结果发现, 与对照组相比, 加入 H_2O_2 后凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表

达增加 41.7% 和 57.3% ($P < 0.01$), Bcl-2 表达降低 42.6% ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 组相比, H_2O_2 +S1P 组蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达降低 17.0% 和 16.1% ($P < 0.05$), Bcl-2 表达增加 34.6% ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, H_2O_2 +S1P+PF-562271 组凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达降低 19.3% 和 19.4% ($P < 0.05$), Bcl-2 表达增加 12.8% ($P < 0.05$; 图 5B)。同时, 结果显示, 与对照组相比, 加入 H_2O_2 后, Pyk2 和 MCU 表达增加 59.8% 和 36.4% ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 组相比, H_2O_2 +S1P 组 Pyk2 和 MCU 表达降低 17.6% 和 18.6% ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 +S1P 组相比, 加入 PF-562271 后, Pyk2 和 MCU 表达降低 23.1% 和 15.0% ($P < 0.05$; 图 5B)。说明 S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 减轻上述线粒体损伤以及损伤引起的 ROS 变化和细胞凋亡, 并且可能与 MCU 有关。

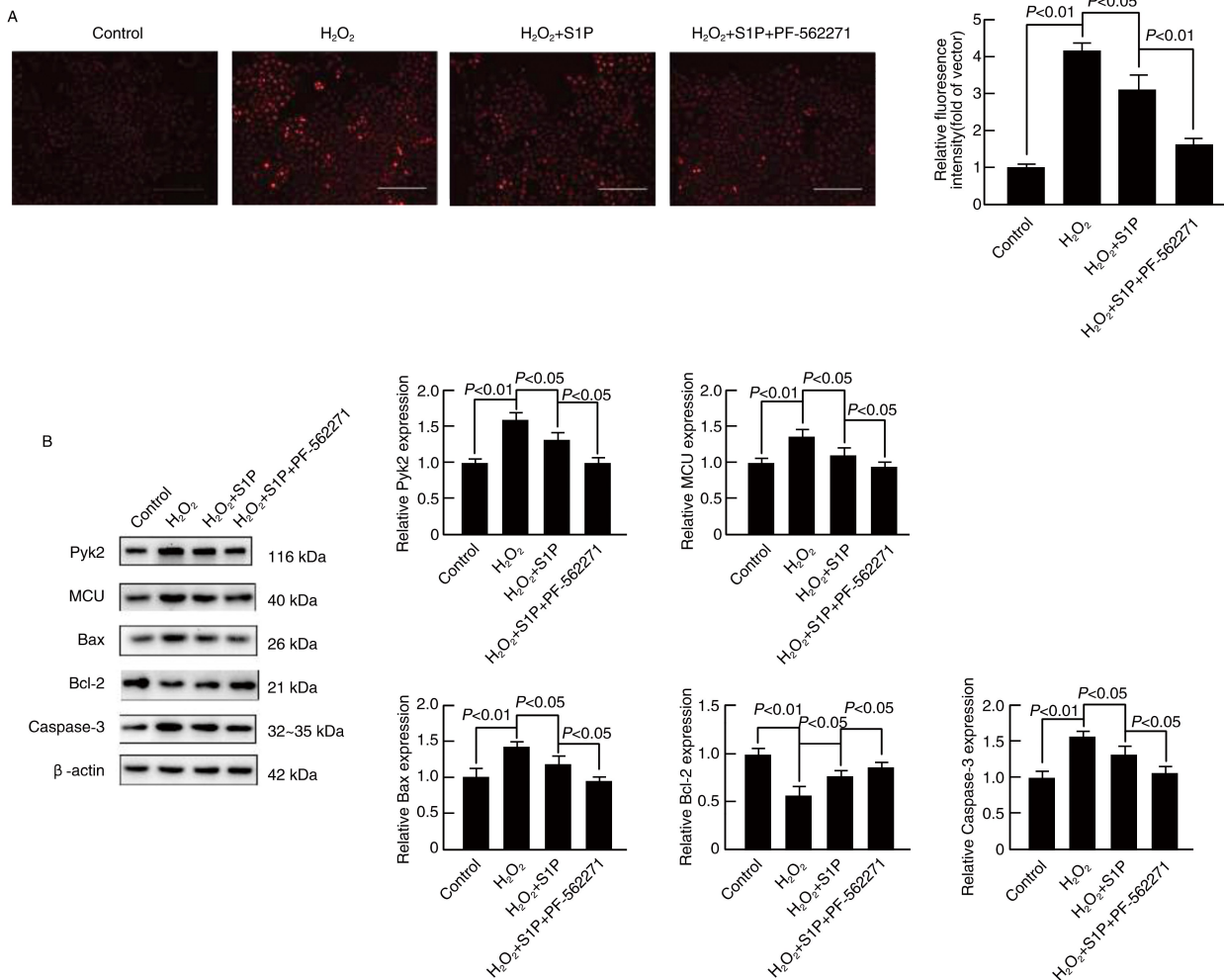


图 5. S1P/S1PR1 抑制 Pyk2 降低 H_2O_2 诱导的 HUVEC 的 ROS 水平并抑制细胞凋亡

A 为 DHE 检测 ROS 水平 (Bar = 300 μ m) 及定量分析。B 为 Western blot 检测 Pyk2、MCU、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达及定量分析。

Figure 5. S1P/S1PR1 inhibits Pyk2 to reduce H_2O_2 -induced ROS levels and inhibit cell apoptosis in HUVEC

2.3.2 S1P/S1PR1 通过抑制 Pyk2 减轻线粒体结构和功能的损伤 为进一步探究 S1P/S1PR1 如何调节 Pyk2 减轻 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体损伤,本研究使用 Pyk2 抑制剂处理 HUVEC,借助透射电镜观察线粒体的形态和结构。结果显示,与对照组相比,加入 H₂O₂ 后线粒体肿胀,体积增大,线粒体嵴减少,甚至线粒体膜破裂,加入 S1P 后上述线粒体形态结构损伤减轻。与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+PF-562271 组线粒体形态结构损伤较轻(图 6A)。

接下来,本研究使用 Rhod-2 AM 荧光探针检测线粒体 Ca²⁺水平。与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,线粒体 Ca²⁺水平升高 6.1 倍($P<0.01$);加入 S1P 后,线粒体 Ca²⁺水平下降 33.9% ($P<0.01$);与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+PF-562271 组线粒体 Ca²⁺水平降低 49.7% ($P<0.01$;图 6B)。随后检测了线粒体膜电位水平的变化。与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,红色荧光减弱,绿色荧光增强,线粒体膜电位水平降低 49.3% ($P<0.01$);而加入 S1P 后,红色荧光增强,绿色荧光减弱,线粒体膜电位水平升高 24.1% ($P<0.05$);与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+PF-562271 组线粒体膜电位水平升高 20.8% ($P<0.05$,图 6C)。流式细胞术结果与荧光结果一致(图 6D)。最后本研究使用 Calcein AM 荧光探针检测了线粒体通透性转换孔的变化。与对照组相比,加入 H₂O₂ 后,绿色荧光减弱,线粒体通透性转换孔开放程度增加 41.5% ($P<0.01$);而加入 S1P 后,绿色荧光增强,线粒体通透性转换孔开放程度减弱 19.2% ($P<0.05$);与 H₂O₂+S1P 组相比,H₂O₂+S1P+PF-562271 组线粒体通透性转换孔开放程度减弱 22.6% ($P<0.05$;图 6E)。

3 讨论

氧化应激在多种心血管疾病,包括 As 的发生中起重要作用。氧化应激的核心原因是自由基的生成与抗氧化防御系统失衡,导致细胞内环境损害、内皮 NO 生成减弱、血管通透性增加,从而引发内皮功能障碍并促进 As 发展^[16]。内皮细胞功能障碍是 As 的启动因素,内皮细胞凋亡则是其显著表现。氧化应激是导致内皮细胞损伤的关键因素,影响线粒体的功能。线粒体功能受损时,线粒体质量控制系统调节分裂、融合、生成等过程以恢复其功能。线粒体功能障碍通常表现为线粒体膜电位、MPTP 的开放程度和线粒体 Ca²⁺水平变化等^[17]。本研究以

HUVEC 为研究对象,采用 400 μmol/L 的 H₂O₂ 处理细胞 2 h,建立氧化应激模型。实验结果表明,与对照组相比,H₂O₂ 诱导的细胞线粒体肿胀、体积增大、线粒体嵴减少甚至膜破裂,线粒体 Ca²⁺水平升高、线粒体通透性转换孔开放程度增加、线粒体膜电位水平下降、ROS 水平升高,同时凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达上调,Bcl-2 表达下调,Pyk2 和 MCU 表达增加。这些结果表明氧化应激引起了线粒体结构和功能损伤,并促进了线粒体相关的细胞凋亡。S1P 是一种生物活性脂类,主要通过 S1PR (S1PR1 ~ S1PR5) 发挥作用^[18],在内皮细胞中 S1PR1 高表达。本研究进一步探讨了 S1P 对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体损伤及细胞凋亡的影响。结果发现,6.4 μmol/L 的 S1P 可有效减轻 H₂O₂ 诱导的细胞损伤,改善线粒体形态,降低线粒体 Ca²⁺水平、线粒体通透性转换孔开放程度及 ROS 水平,提高线粒体膜电位水平,并降低 Bax 和 Caspase-3 表达,升高 Bcl-2 表达。此外,S1P 可降低 Pyk2 和 MCU 的表达。

进一步研究表明,氧化应激下 S1PR1 表达下降,S1P 处理后 S1PR1 表达恢复,而 S1PR3 表达无显著变化。通过使用 S1PR1 激动剂 SEW2871,发现其可进一步改善 S1P 的保护作用,而 S1PR1 拮抗剂 W146 则削弱 S1P 的保护作用,进一步证实 S1P 通过 S1PR1 发挥作用,改善线粒体损伤。MCU 通道通过调节线粒体 Ca²⁺的摄取来控制线粒体功能,Pyk2 是调节 MCU 活性的关键酪氨酸激酶,参与细胞内 Ca²⁺的调节^[19]。为探讨 S1P/S1PR1 是否通过 Pyk2 发挥作用,本研究加入 Pyk2 抑制剂 PF-562271,结果发现其削弱了 S1P 的保护作用,提示 S1P/S1PR1 可能通过抑制 Pyk2 改善 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体损伤,并抑制线粒体相关细胞凋亡。这表明 S1P 通过 S1PR1 抑制 Pyk2,进一步调节 MCU,来缓解 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤和凋亡。

在研究 Ca²⁺在线粒体损伤和凋亡中的作用时,本研究未深入探讨 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤、HUVEC 凋亡以及 S1P/S1PR1/Pyk2 的保护作用是否与 Ca²⁺调控相关。此外,尚未确认 MCU 是否参与 S1P/S1PR1 缓解 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤或抑制 Pyk2 从而抑制与线粒体相关的凋亡。未来的研究将进一步探索这些问题。同时,已有研究表明,S1P 通过 S1PR1/3/细胞肉瘤酪氨酸激酶 (cellular sarcoma tyrosine kinase, c-Src)/Pyk2/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径

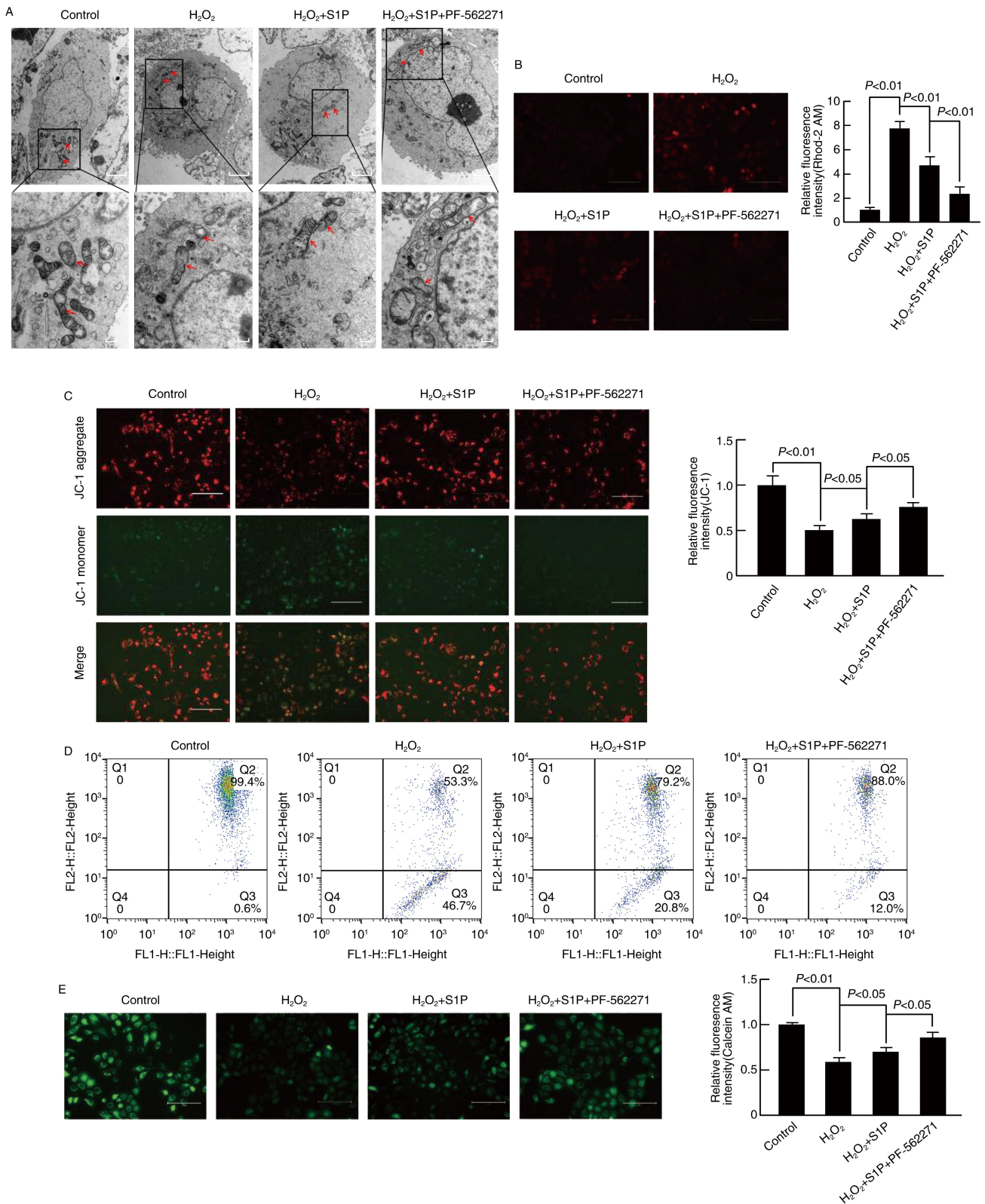


图 6. S1P/S1PR1 抑制 Pyk2 减轻线粒体结构和功能的损伤

A 为透射电镜观察 S1P 处理后 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体形态和结构, 上方插图表示线粒体 (Bar=25 μm), 下方为放大图像 (Bar=5 μm), 红色箭头指示线粒体。B 为 Rhod-2 AM 检测线粒体 Ca²⁺ 水平 (Bar=300 μm) 及定量分析。

C 为 JC-1 检测线粒体膜电位 (Bar=150 μm) 及定量分析。D 为流式细胞术检测线粒体膜电位分析。

E 为 Calcein AM 检测线粒体通透性转换孔的开放程度 (Bar=150 μm) 及定量分析。

Figure 6. S1P/S1PR1 inhibits Pyk2 to alleviate mitochondrial structural and functional damage

激活转录因子激活蛋白1(activator protein-1, AP-1),进而调节环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达和前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的产生^[20]。c-Src受H₂O₂调控,提示S1P/S1PR1可能通过调控Pyk2表达,影响氧化应激引起的血管内皮细胞线粒体损伤^[21]。未来研究需要解决这些问题。

总之,本研究表明S1P/S1PR1通过调节Pyk2和MCU,缓解H₂O₂诱导的线粒体损伤,并抑制内皮细胞凋亡,提示S1PR调节剂可能为治疗心血管疾病提供新的治疗思路。

[参考文献]

- [1] 徐倩, 姜志胜. 动脉粥样硬化机制研究的新认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(11): 921-931.
XU Q, JIANG Z S. New insights into the mechanisms of atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(11): 921-931.
- [2] LIU W, ÖSTBERG N, YALCINKAYA M, et al. Erythroid lineage Jak2V617F expression promotes atherosclerosis through erythrophagocytosis and macrophage ferroptosis[J]. J Clin Invest, 2022, 132(13): e15572.
- [3] WOO S H, KYUNG D, LEE S H, et al. TXNIP suppresses the osteochondrogenic switch of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2023, 132(1): 52-71.
- [4] BU L L, YUAN H H, XIE L L, et al. New dawn for atherosclerosis: vascular endothelial cell senescence and death[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20): 15160.
- [5] DUAN H, ZHANG Q, LIU J, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis[J]. Pharmacol Res, 2021, 168: 105599.
- [6] 朱诗瑶, 贺雪珂, 陈豪, 等. 硝基化修饰蛋白质在血管内皮功能障碍中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(1): 65-71.
ZHU S Y, HE X K, CHEN H, et al. The role of nitrated modified proteins in cardiovascular endothelial dysfunction[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(1): 65-71.
- [7] KHALIL M, KHALIFEH H, SAAD F, et al. Protective effects of extracts from ephedra foeminea Forssk fruits against oxidative injury in human endothelial cells[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 112976.
- [8] D'ONOFRIO N, PRATTICCHIZZO F, MARTINO E, et al. MiR-27b attenuates mitochondrial oxidative stress and inflammation in endothelial cells[J]. Redox Biol, 2023, 62: 102681.
- [9] LIN Y, DING Y, WU Y, et al. The underestimated role of mitochondria in vitiligo: from oxidative stress to inflammation and cell death[J]. Exp Dermatol, 2024, 33(1): e14856.
- [10] CHEN Y, LI Z, ZHANG H, et al. Mitochondrial metabolism and targeted treatment strategies in ischemic-induced acute kidney injury[J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1): 69.
- [11] KANDASAMY J, LI R, VAMESU B M, et al. Mitochondrial DNA variations modulate alveolar epithelial mitochondrial function and oxidative stress in newborn mice exposed to hyperoxia[J]. bioRxiv, 2023. DOI: 10.1101/2023.05.17.541177.
- [12] FERNANDEZ-SANZ C, DE LA FUENTE S, SHEU S S. Mitochondrial Ca²⁺ concentrations in live cells: quantification methods and discrepancies[J]. FEBS Lett, 2019, 593(13): 1528-1541.
- [13] ZHANG Y, LI J J, XU R, et al. Nogo-B mediates endothelial oxidative stress and inflammation to promote coronary atherosclerosis in pressure-overloaded mouse hearts[J]. Redox Biol, 2023, 68: 102944.
- [14] OUYANG J, SHU Z, CHEN S, et al. The role of sphingosine 1-phosphate and its receptors in cardiovascular diseases[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10290-10301.
- [15] SENTHILKUMAR G, KATUNARIC B, ZIRGIBEL Z, et al. Necessary role of ceramides in the human microvascular endothelium during health and disease[J]. Circ Res, 2024, 134(1): 81-96.
- [16] MOLINAR-INGLIS O, BIRCH C A, NICHOLAS D, et al. aPC/PAR1 confers endothelial anti-apoptotic activity via a discrete, β -arrestin-2-mediated SphK1-S1PR1-Akt signaling axis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(49): e2106623118.
- [17] LIU Z, HAN X, YOU Y, et al. Shuangshenningxin formula attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury through improving mitochondrial function[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 323: 117690.
- [18] LI J, HUANG Y, ZHANG Y, et al. S1P/S1PR signaling pathway advancements in autoimmune diseases[J]. Biomol Biomed, 2023, 23(6): 922-935.
- [19] DE PINS B, MENDES T, GIRALT A, et al. The non-receptor tyrosine kinase Pyk2 in brain function and neurological and psychiatric diseases[J]. Front Synaptic Neurosci, 2021, 13: 749001.
- [20] HSU C K, LEE I T, LIN C C, et al. Sphingosine-1-phosphate mediates COX-2 expression and PGE2/IL-6 secretion via c-Src-dependent AP-1 activation[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(3): 702-715.
- [21] FÃO L, MOTA S I, REGO A C. C-Src regulates Nrf2 activity through PKC δ after oxidant stimulus[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(4): 686-698.

(此文编辑 许雪梅)