康婷,毛海霞,林佳如,等. 自噬在慢性肾病血管钙化中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 51-60.
Kang T, Mao HX, Lin JR, et al. Effects of autophagy on vascular calcification in chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 51-60.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.007

自噬在慢性肾病血管钙化中的作用研究

康　婷[1,2],毛海霞[1,2],林佳如[1,2],朱婷婷[1,2],张丽玲[1,2],张冬梅[1,2],吴蔚桦[1,2],欧三桃[1,2*]

(1.西南医科大学附属医院肾病内科,四川 泸州　646000; 2.四川省肾脏疾病临床医学研究中心,四川 泸州　646000)

【摘要】　目的　探索自噬与 CKD 血管钙化之间的关系,以及自噬在 CKD 血管钙化中的作用。**方法**　首先将 30 只 SD 大鼠随机分为对照组(Control 组,15 只)和腺嘌呤及高磷饮食诱导的模型组(CKD 组,15 只)。免疫组化检测主动脉中 α-SMA、RUNX2、LC3B 及 Beclin-1 蛋白表达,新鲜主动脉做钙含量测定,进一步做它们之间的相关性分析。再构建 β-GP 诱导的主动脉平滑肌细胞(aorta smooth muscle cell,ASMC)钙化模型。电镜检测细胞内自噬小体,免疫荧光及 Western blot 检测 LC3B 蛋白。自噬抑制剂 3-MA 及激活剂 RAP 干预自噬后,采用免疫组化、Western blot 检测 ASMC 中 α-SMA、RUNX2 蛋白表达变化,茜素红染色及钙含量检测 ASMC 钙化情况。**结果**　模型组成功建立 CKD 血管钙化模型。与对照组相比,模型组主动脉 α-SMA 蛋白表达下降,RUNX2、LC3B、Beclin-1 蛋白表达及钙含量升高。Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达分别与主动脉钙含量及 RUNX2 蛋白表达呈正相关。β-GP 诱导 ASMC 自噬小体增加,LC3B 荧光斑点增多,LC3BII 蛋白表达增强($P<0.01$)。RAP 激活自噬后减少 ASMC 钙沉积及钙含量($P<0.05$),减少 RUNX2 蛋白表达($P<0.05$),促进 α-SMA 蛋白表达($P<0.05$);3-MA 抑制自噬后结果与之相反。**结论**　CKD 血管钙化同时存在自噬激活,自噬在 CKD 血管钙化中可能具有内源性保护作用,自噬有望成为 CKD 血管钙化新的治疗靶目标。

【关键词】　慢性肾病;血管钙化;动脉平滑肌细胞;自噬;成骨样分化
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 01-0051-10

Effects of autophagy on vascular calcification in chronic kidney disease

KANG Ting[1,2], MAO Haixia[1,2], LIN Jiaru[1,2], ZHU Tingting[1,2], ZHANG Liling[1,2], ZHANG Dongmei[1,2], WU Weihua[1,2], OU Santao[1,2*]

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

【Abstract】　Objective　To explore the association and role of autophagy in vascular calcification of chronic kidney disease. **Methods**　Overall, 30 SD rats were randomly divided into a control group (Control group, $n=15$) and adenine and high phosphorus diet-induced model group (CKD group, $n=15$). Immunohistochemistry was applied to detect α-SMA, RUNX2, LC3B and Beclin-1 in the aorta. Calcium content was measured to further analyze the correlation between them. Aorta smooth muscle cell (ASMC) calcification was induced by β-GP. Autophagy activation was detected by electron microscopy, immunofluorescence, and Western blot. After 3-MA and RAP regulation of autophagy, immunohistochemistry and Western blot were used to detect α-SMA and RUNX2 protein expression, and alizarin red staining and calcium contents were used to detect calcification of ASMC. **Results**　Compared with the control group, vascular calcification was established in the CKD group. RUNX2, LC3B and Beclin-1 proteins, and calcium content were higher in the CKD group

[基金项目]四川省肾脏疾病临床医学研究中心重点项目(2019YFS0537-3)。
[作者简介]康婷(1993—),女,医师,硕士,研究方向:慢性肾病与血管钙化。E-mail: 409875863@qq.com
[通信作者]欧三桃(1976—),女,教授,博士,研究方向:慢性肾病与血管钙化。E-mail: ousantao@163.com

than in the control group, while α-SMA protein expression had declined. Correlation analysis showed that Beclin-1 and LC3B protein expression were positively correlated with aortic calcium content and RUNX2 protein expression, respectively. β-GP induced ASMC calcium deposition and osteogenic differentiation. β-GP induced an increase of autophagosomes, LC3B fluorescent spots, and LC3BII protein expression ($P<0.01$). After autophagy activation by RAP, calcium deposition and content ($P<0.05$) and RUNX2 protein expression ($P<0.05$) were reduced, while α-SMA protein expression was promoted ($P<0.05$). After-autophagy inhibition by 3-MA, calcium deposition and content were increased ($P<0.05$), RUNX2 protein expression was promoted ($P<0.05$), and α-SMA protein expression was decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Autophagy might play a protective role in CKD vascular calcification. Autophagy is expected to become a new therapeutic target for CKD vascular calcification.

【**Keywords**】 chronic kidney disease; vascular calcification; aorta smooth muscle cell; autophagy; osteogenic differentiation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是心血管疾病独立的风险因素,反过来心血管疾病也是CKD患者高死亡率的首要原因.有研究发现血管钙化是导致CKD患者心血管疾病发病率和死亡率呈倍数增长的主要危险因素[1]。目前认为血管钙化是一种血管平滑肌细胞由收缩表型向成骨样表型转分化的生物学过程[2]。CKD血管钙化的发生机制非常复杂,近期有研究发现尿毒症患者钙化的肾动脉较移植肾的肾动脉自噬相关蛋白明显增加,自噬可能参与了尿毒症患者血管钙化的形成[3]。由于自噬是一种动态的调节系统,越来越多的研究发现自噬在血管钙化中的作用会受疾病过程、诱发因素以及周围微环境等多种因素的影响,甚至在血管钙化中有保护性自噬和非保护性自噬两种观点,其机制尚不完全清楚[4]。目前,自噬与CKD血管钙化的关系研究较少,自噬在血管钙化中的作用很复杂,因此本研究旨在通过体内、外实验探讨自噬在高磷诱导的CKD血管钙化中的激活情况及其作用,为CKD血管钙化的防治提供新策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选用SPF级SD雄性大鼠30只,6周龄,体重250~280 g,购自西南医科大学城北校区动物中心[SCXK(川)2018-0017],于西南医科大学城北校区动物房饲养[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU2020262),并遵守实验动物的3R原则。

1.1.2 细胞

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A7R5),购自中国科学研究院(上海细胞库)。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471,美国Sigma公司);1.8%高磷饮食(北京科奥协力);钙含量测定试剂盒(C004-2-1,南京建成生物有限公司);β-甘油磷酸钠(β-glycerophosphate, β-GP)及氯喹(chloroquine, CQ)(G9422, C6628, 美国Sigma公司);雷帕霉素(rapamycin, RAP)及3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(S1039, S2767, Selleck公司);α-SMA多克隆抗体(BS70000,南京巴傲得生物科技有限公司);兔抗RUNX2多克隆抗体(bs-20003R,北京博奥森生物技术有限公司);Beclin-1兔单克隆抗体、LC3B兔单克隆抗体及鬼笔环肽(Phalloidin)(#3495,#3868,#8953,美国CST公司)。光学显微镜(Nikon公司);全自动生化分析仪(西门子,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模

将SD大鼠随机分为对照组(Control,15只)和CKD血管钙化模型组(CKD,15只)。模型组大鼠给予腺嘌呤混悬液(200 mg/(kg·d))灌胃+1.8%高磷饮食,而对照组大鼠予以相应等体积的生理盐水及正常饮食,持续灌胃给药6周。

1.3.2 取材

成模后用代谢笼收集24 h尿液用于检测24 h尿蛋白,取材当天使用1%戊巴比妥钠按照40 mg/kg剂量腹腔注射麻醉大鼠,取下腔静脉血检测生化指标;取右肾做常规石蜡包埋、切片;游离胸腹主动脉,部分做常规石蜡包埋切片,部分新鲜组织做钙含量测定。

1.3.3 生化指标检测

采用自动生化分析仪检测血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、血钙(Ca)、血磷(P)及24 h尿蛋白。

1.3.4　HE 染色

常规脱蜡复水,苏木素染 5 min 后,1%盐酸酒精分色 2 s,0.5%氨水返蓝 1 min,75%乙醇 2 s,1%伊红 30 s,脱水透明封片。

1.3.5　茜素红染色

石蜡切片常规脱蜡复水,滴加茜素红 S 液染色 30 min,用双蒸水洗 5 min 共 3 次,常规脱水、透明、封片。

1.3.6　Masson 染色

按照 Masson 染色试剂盒说明书进行操作。常规脱水、透明、封片,在光镜视野下观察拍摄。

1.3.7　钙含量测定

大鼠主动脉组织匀浆后取上清液,按照试剂盒说明书加入工作液及上清液,混匀后使用酶标仪测定 OD 值,BCA 法测定主动脉总蛋白浓度,主动脉钙含量(mmol/g pro)=(测定 OD 值-空白 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)×标准品浓度(1 mmol/L)/待测样本蛋白浓度(mmol/g)。

1.3.8　免疫组化法检测胸腹主动脉蛋白的表达

常规脱蜡水化,修复抗原,蒸馏水浸泡 5 min,3% H_2O_2 孵育 15 min,山羊血清室温封闭 20 min。分别滴加一抗(RUNX2、α-SMA、LC3B、Beclin-1),4℃冰箱过夜,依次滴加相应的二抗、辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 20 min,DAB 显色液,显微镜下观察显色情况,棕黄色或棕褐色为阳性表达。蒸馏水充分冲洗,苏木素复染 20 s,脱水,透明,封片。

1.3.9　细胞培养及分组

将大鼠胸主动脉平滑肌细胞(aortic smooth muscle cell, ASMC)培养在含有 15%胎牛血清 DMEM 高糖完全培养基的基础培养基中作为正常组(Normal),加入 10 mmol/L β-GP 刺激诱导细胞钙化的细胞作为高磷组(β-GP)。干预分组:用 25 μmol/L CQ 干预自噬的降解过程,预处理 30 min 后再分别加入基础培养基和含有 10 mmol/L β-GP 的培养基,分为氯喹组(CQ)、高磷+氯喹组(β-GP+CQ),并与正常组(Normal)、高磷组(β-GP)做对照。再分别用 100 nmol/L RAP 及 5 mmol/L 3-MA 干预自噬强弱,预处理细胞 30 min 后分别加入含有 10 mmol/L β-GP 的培养基,分为高磷+雷帕霉素组(β-GP+RAP)、高磷+3-甲基腺嘌呤组(β-GP+3-MA),并与正常组(Normal)、高磷组(β-GP)作对照。将不同时间点的不同组别细胞做好标记后置于 37℃、5% CO_2 培养箱继续培养。

1.3.10　细胞免疫组化

将细胞固定,破膜,滴加 10%正常山羊血清封闭液室温下 20 min,,滴加 α-SMA 抗体或 RUNX2 抗体,于 4℃冰箱孵育过夜,滴加二抗工作液,室温孵育 20 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 20 min, DAB 溶液显色,PBS 冲洗后苏木素复染细胞核 5 min,PBS 洗净后吸水纸吸干爬片上的液体,封片。

1.3.11　细胞免疫荧光

将细胞固定,破膜,滴加 10%山羊血清封闭 30 min,滴加 LC3B 抗体,于 4℃冰箱过夜,滴加 10%山羊血清稀释的荧光二抗孵育 1 h,避光滴加鬼笔环肽染细胞质,再滴加 DAPI 细胞核,避光清洗后,封片,荧光显微镜下观察。

1.3.12　钙含量测定

1.5 mL 0.6 mol/L 盐酸进行细胞脱钙,24 h 后收集细胞上清液,根据钙测试盒说明书(微板法)测定钙含量;PBS 洗涤细胞后加入 1.5 mL 1 mol/L NaOH/0.1% SDS 裂解细胞,并提取细胞上清液,BCA 法测定蛋白含量,结果以钙含量/蛋白含量(mmol/g pro)表示。

1.3.13　Western blot

裂解并提取细胞蛋白,依照碧云天公司的 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定上清液蛋白浓度,SDS-Loading buffer 进行稀释,干煮,配胶,上样,在不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶中电泳,转膜,封闭,加入 LC3B、Beclin-1、RUNX2 及 α-SMA 孵育,在 4℃冰箱过夜,再用二抗稀释液室温孵育 1~2 h,显色液显色,曝光检测。

1.3.14　电镜

收集细胞后依次 0.5%戊二醛、3%戊二醛、1%四氧化锇固定,丙酮脱水,环氧树脂渗透液进行渗透,包埋,制成超薄切片后,依次用醋酸铀、枸橼酸铅染色,室温下染 15~20 min,透射电镜下观察。

1.4　统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。计量资料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,方差不齐时采用 Kruskal-Wallis H 检验,Pearson 做两个变量之间的相关性分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2　结果

2.1　两组大鼠生化指标比较

与对照组大鼠相比,CKD 钙化组大鼠 Scr、

BUN、P 及 24 h 尿蛋白均有不同程度的升高,Ca 降低,差异具有统计学意义。见图 1。

2.2 两组大鼠肾病理改变

对照组大鼠肾小球大小正常,肾小管及肾间质结构与形态无明显异常。CKD 钙化组大鼠肾 HE 染色结果显示肾小球及肾小管中可见大量的棕黄色物质沉积,肾小球囊腔有轻度扩张,部分肾小管扩张,肾间质纤维化;Masson 染色结果显示:肾小球基底膜增厚,同时可见少数的肾小球硬化,肾间质广泛蓝染的胶原纤维。见图 2。

2.3 两组大鼠主动脉钙化情况

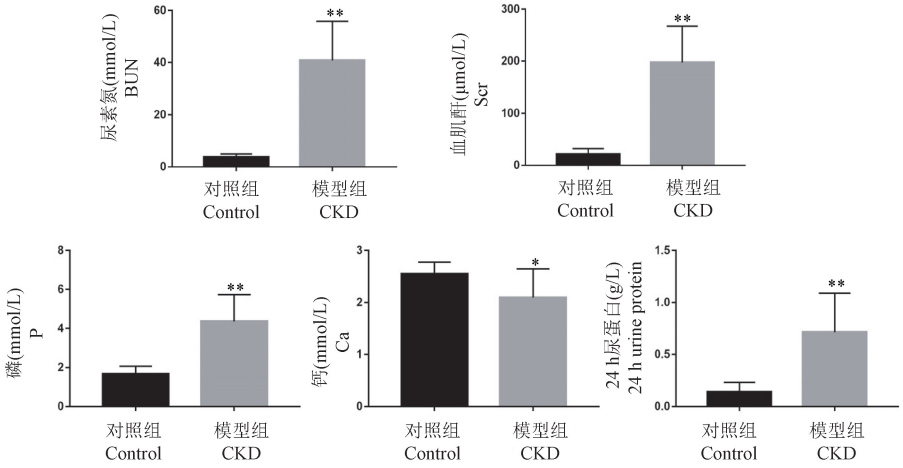
HE 染色可见对照组大鼠主动脉染色均匀,血管壁完整,弹性纤维连续;而 CKD 钙化组大鼠主动脉中膜层颜色加深,弹性纤维明显断裂,血管平滑肌细胞排列紊乱。茜素红染色结果显示与对照组相比,CKD 钙化组大鼠主动脉中膜层广泛分布红染的钙结节沉积。此外,CKD 组主动脉钙含量也较对照组更高,差异具有统计学意义。见图 3。

2.4 大鼠主动脉成骨样分化及自噬相关蛋白表达

免疫组化结果显示:对照组大鼠主动脉平滑肌细胞质中可见 α-SMA 蛋白均匀分布,而 RUNX2 无明显表达。CKD 大鼠动脉血管壁中膜弹性纤维断裂,中膜层平滑肌细胞可见 α-SMA 蛋白表达明显减少,而 RUNX2 蛋白表达增加,差异具有统计学意义。LC3B、Beclin-1 是目前最常用的自噬相关蛋白标记物,可用于静态观察自噬的激活情况。免疫组化结果显示:对照组大鼠动脉血管壁各层细胞中均有少量的 LC3B、Beclin-1 蛋白表达,而 CKD 大鼠动脉血管壁中膜层平滑肌细胞排列紊乱,棕黄色染色明显加深,LC3B、Beclin-1 蛋白表达增强,差异具有统计学意义。见图 4。

2.5 相关性分析

Pearson 相关分析显示,大鼠主动脉钙含量与 Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达呈正相关关系,RUNX2 蛋白与 Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达也呈正相关关系。见图 5。



注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$。

图 1 两组大鼠生化指标的比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Comparison of biochemical indexes in two groups of rats

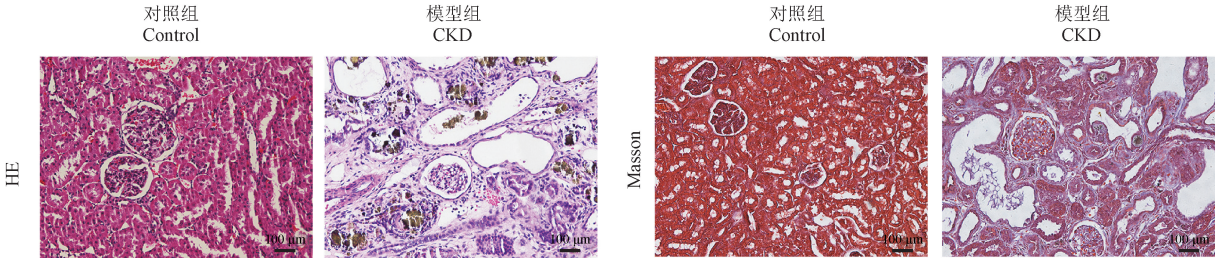


图 2 两组大鼠肾 HE 及 Masson 染色

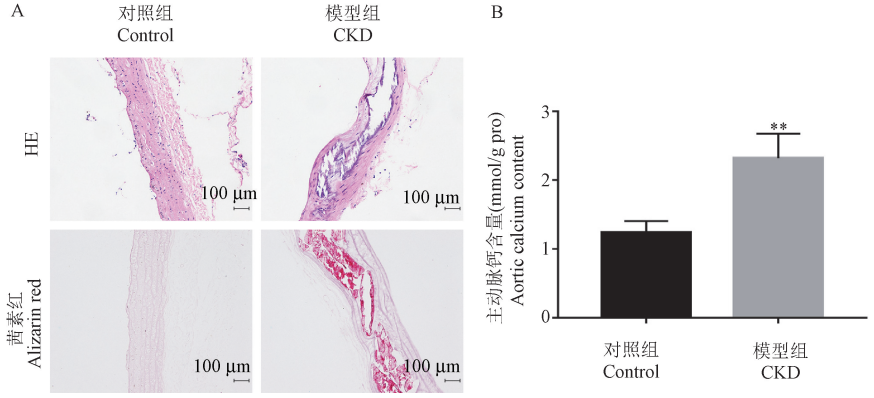
Figure 2 HE and Masson staining of kidney in two groups of rats

2.6　β-GP 诱导大鼠 ASMC 钙化及成骨样分化

使用 10 mmol/L β-GP 刺激 ASMC 3、5、7 d 后，茜素红染色结果显示 β-GP 组较正常组(Normal)有明显的橘红色钙化结节，且随时间的的延长逐渐增多。免疫组化结果也显示，随着时间的延长，β-GP 组较正常组细胞质内 α-SMA 表达逐渐减少，而分布在细胞核内的 RUNX2 表达则逐渐增加，以上结果提示 β-GP 成功诱导了 ASMC 钙化，并逐渐向成骨样分化，且具有时间依赖性。见图 6。

2.7　β-GP 诱导大鼠 ASMC 自噬增强

β-GP 刺激大鼠 ASMC 48 h 后，免疫荧光结果显示：两组细胞红色荧光信号的平滑肌细胞质骨架及蓝色荧光信号的细胞核结构清晰，β-GP 组较正常组绿色荧光信号 LC3B 表达明显增强，Merge 后显示 LC3B 呈斑点状分布在细胞质中(见图 7A)。透射电镜检测结果显示：与正常组相比，β-GP 组大鼠 ASMC 细胞质中可见溶酶体与自体吞噬体融合，自噬小体明显增多，提示 β-GP 诱导的 ASMC 钙化模型中存在明显的自噬(见图 7B)。Western blot 结果显示：β-GP 组较正常组 LC3BII 蛋白相对表达量增加，加入溶酶体抑制剂 CQ 抑制自噬的降解过程，可见 β-GP+CQ 组较 β-GP 组 LC3BII 表达明显增多，同时 β-GP+CQ 组较 CQ 组 LC3BII 表达也明显增多(见图 7C)。以上结果提示 β-GP 对大鼠 ASMC 的刺激促进了自噬激活过程。

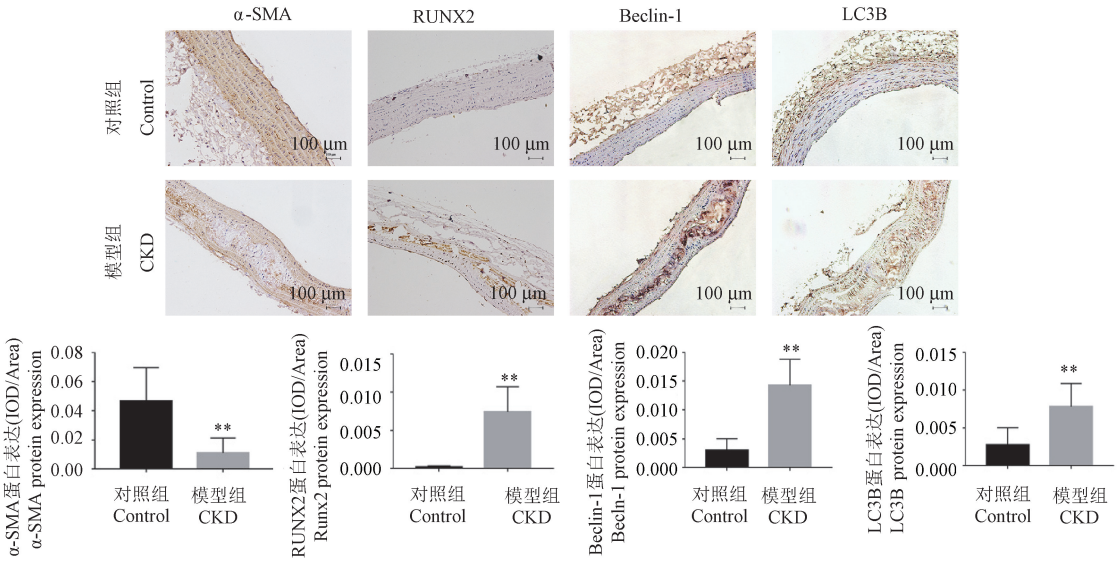


注：A：主动脉 HE 染色及茜素红染色；B：主动脉钙含量比较。与对照组相比，$^{**}P<0.01$。

图 3　两组大鼠胸腹主动脉钙化情况

Note. A, HE staining and Alizarin red staining in aorta. B, Comparison of aortic calcium content. Compared with the control group, $^{**}P<0.01$.

Figure 3　Calcification of thoracoabdominal aorta in two groups of rats



注：与对照组相比，$^{**}P<0.01$。

图 4　两组大鼠主动脉免疫组化染色

Note. Compared with the control group, $^{**}P<0.01$.

Figure 4　Immunohistochemical staining of aorta in two groups of rats

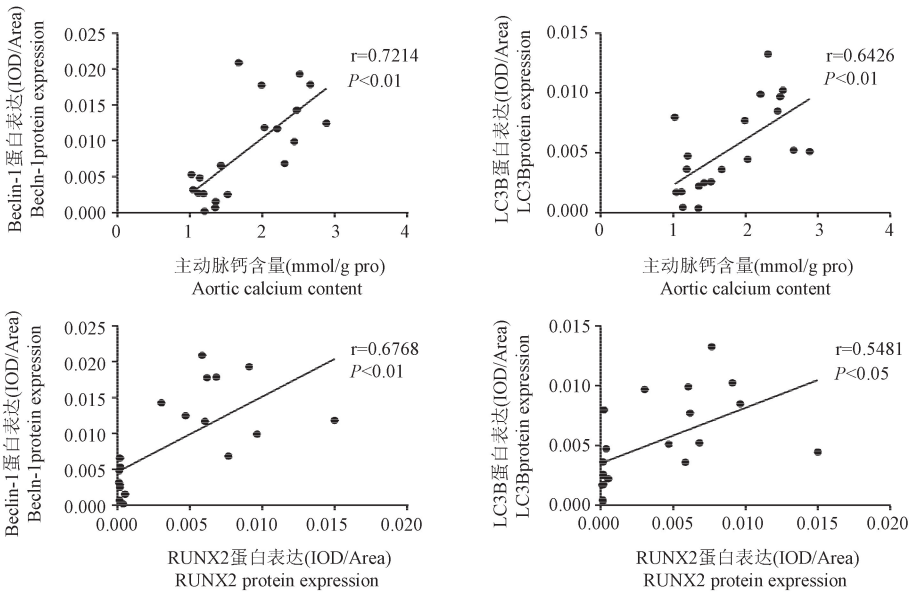


图 5 主动脉钙含量及蛋白的相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of calcium content and protein in aorta

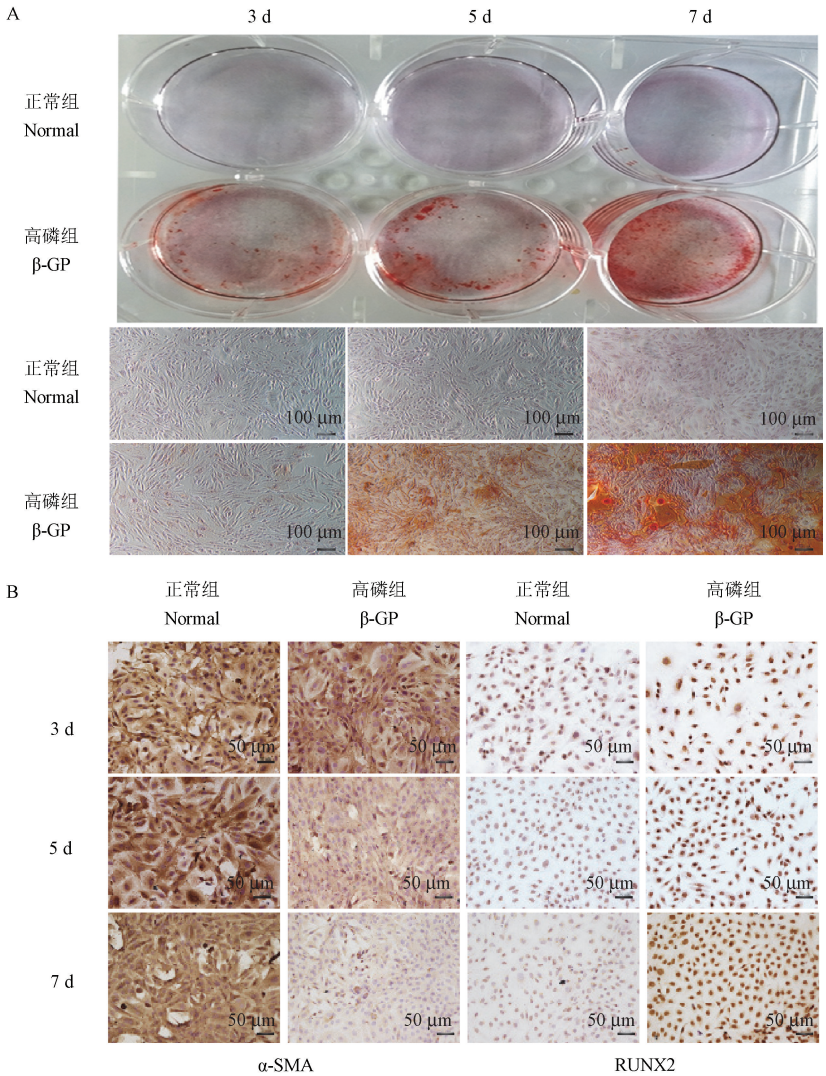
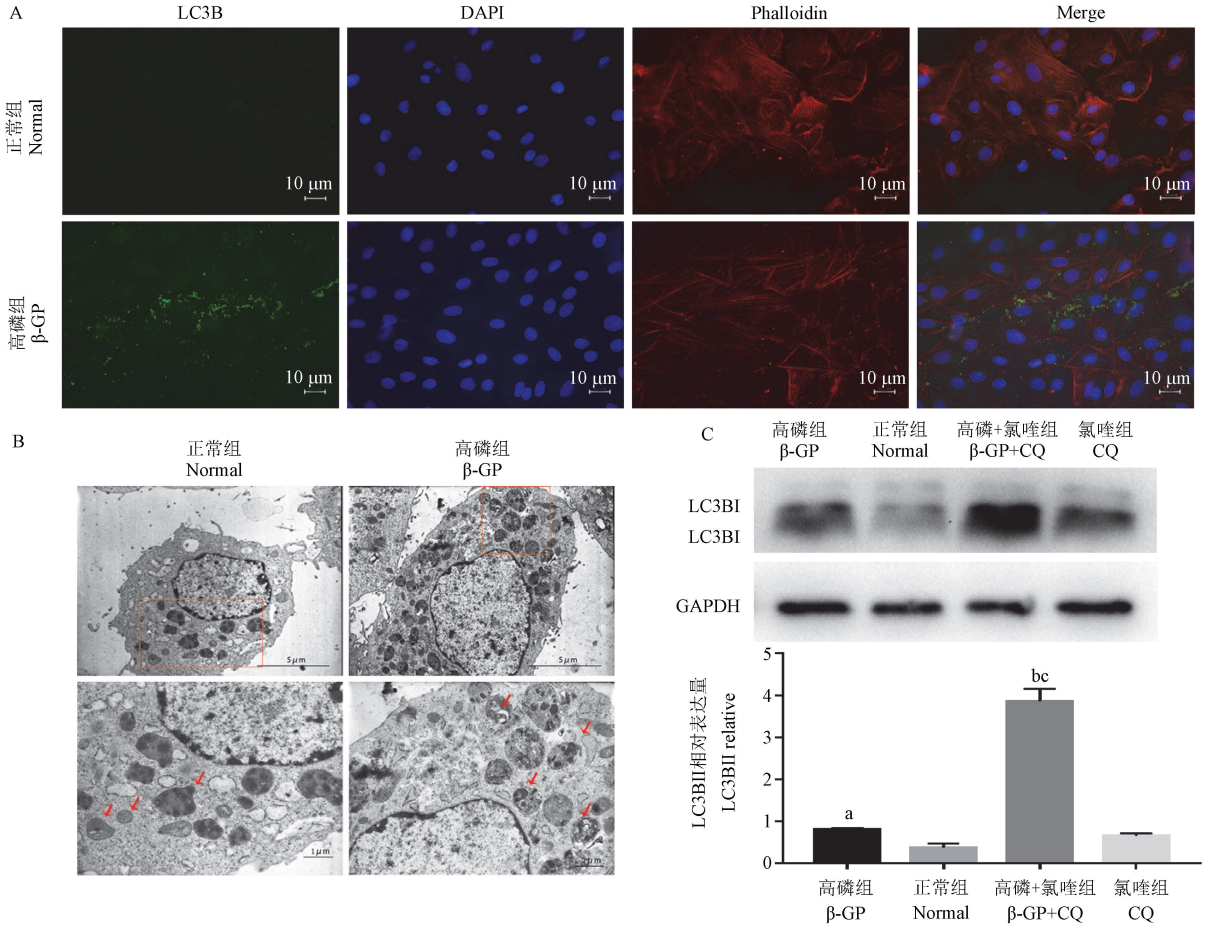


图 6 两组大鼠 ASMC 不同时间点茜素红染色及免疫组化结果

Figure 6 Alizarin red staining and immunohistochemical results of ASMC in two groups at different time points

2.8　增强及抑制自噬对大鼠 ASMC 钙化的影响

为进一步研究自噬对 ASMC 钙化表型的影响，加入自噬抑制剂 3-MA 及激活剂 RAP 干预 7 d 后观察其变化。结果见图 8，Western blot 显示 β-GP 组较正常组 ASMC 中 LC3BII、Beclin-1 蛋白表达升高，加入 3-MA 后 LC3BII、Beclin-1 蛋白表达下降，说明 3-MA 成功地抑制了自噬过程；反之，加入 RAP 后 LC3BII、Beclin-1 表达明显升高，说明 RAP 成功地诱导了自噬增强。同时，β-GP 组较正常组 α-SMA 蛋白表达减少，RUNX2 蛋白表达升高，β-GP+3-MA 组与 β-GP 组比较，α-SMA 蛋白表达明显进一步减少，而 RUNX2 蛋白表达明显进一步升高；反之，β-GP+RAP 组与 β-GP 组比较 α-SMA 蛋白表达明显升高，而 RUNX2 蛋白表达明显减少（见图 8A）。免疫组化显示 β-GP 组较正常组 ASMC 内 α-SMA 蛋白表达减少，而细胞核内 RUNX2 蛋白增多，加入 3-MA 后 α-SMA 蛋白表达明显进一步减少，RUNX2 蛋白仍有大量表达，而加入 RAP 后 α-SMA 蛋白有所增加，RUNX2 蛋白表达减少（见图 8B）。茜素红染色结果显示正常组未见明显钙化结节，β-GP 组可见均匀分布的橘红色钙化结节，β-GP+3-MA 组橘红色钙化结节明显增多，而 β-GP+RAP 组只散在分布少许的钙化结节（见图 8C）。钙含量测定结果也与此一致，与正常组相比，β-GP 组大鼠动脉平滑肌细胞钙含量增多，加入 3-MA 后钙含量进一步升高，而加入 RAP 后钙含量明显降低（见图 8D）。以上结果表明抑制自噬可以加剧 β-GP 诱导的大鼠 ASMC 钙化及成骨样分化，而增强自噬则可以减轻钙化及成骨样分化。

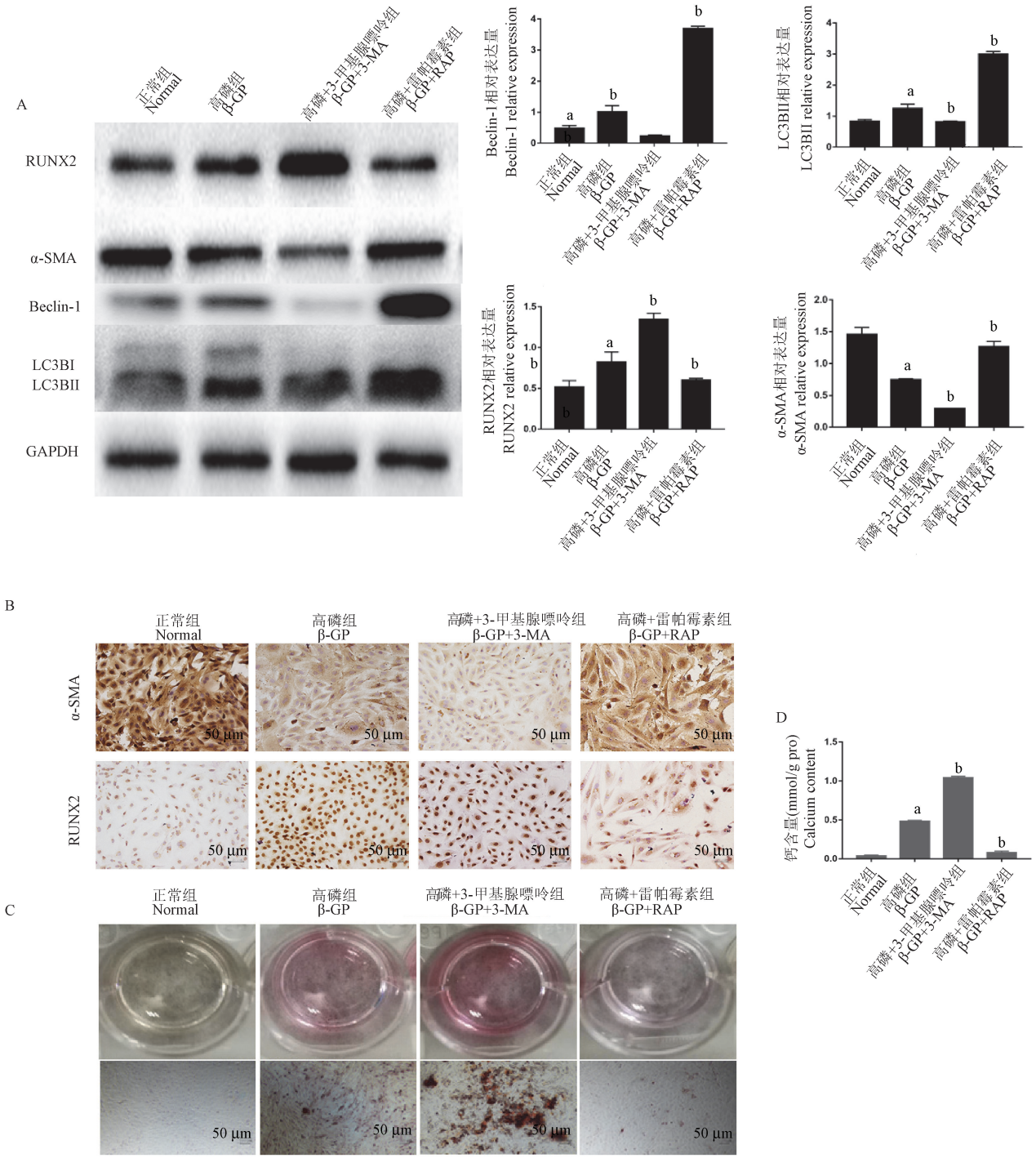


注：A：免疫荧光染色观察 LC3B 的表达分布情况；B：电镜观察自噬小体的形成；C：Western blot 观察 CQ 干预后 LC3B 蛋白表达。与正常组相比，$^{a}P<0.05$；与高磷组相比，$^{b}P<0.05$；与氯喹组相比，$^{c}P<0.05$。

图 7　β-GP 诱导自噬在 ASMC 中的激活情况

Note. A, The distribution of LC3B expression by Immunofluorescence staining. B, The formation of autophagic vesicles by electron microscopy. C, LC3B protein expression after CQ intervention by Western blot. Compared with Normal group, $^{a}P<0.05$. Compared with β-GP group, $^{b}P<0.05$. Compared with CQ group, $^{c}P<0.05$.

Figure 7　β-GP induced autophagy activation in ASMC



注：A：Western blot 观察 RUNX2、α-SMA、Beclin-1、LC3BI、LC3BII 蛋白表达；B：免疫组化观察细胞中 α-SMA 及 RUNX2 染色及分布；C：茜素红染色观察细胞钙沉积；D：细胞钙含量的比较。与正常组相比，$^{a}P<0.05$；与高磷组相比，$^{b}P<0.05$。

图 8 3-MA 及 RAP 干预自噬对 ASMC 钙化的影响

Note. A, RUNX2, α-SMA, Beclin-1, LC3BI, LC3BII protein expressions by Western blot. B, α-SMA and RUNX2 staining and distribution by immunohistochemistry. C, Cellular calcium deposition by alizarin red staining. D, Comparison of cellular calcium content. Compared with Normal group, $^{a}P<0.05$. Compared with β-GP group, $^{b}P<0.05$.

Figure 8 Effects on ASMC calcification after 3-MA and RAP intervention on autophagy

3　讨论

CKD 血管钙化最初被认为仅发生在终末期肾病,近期有研究发现 CKD 早期也可发生血管钙化[5-6]。一项研究纳入 439 例中度 CKD 但无心血管疾病的患者,亚组分析发现,血磷每升高 1 mg/dL,冠状动脉钙化风险增加 21%,胸主动脉钙化增加 33%,主动脉瓣钙化增加 25%,二尖瓣钙化增加 62%[7]。大量研究表明,血磷已成为 CKD 血管钙化的关键调节因子,能以多条途径启动和推进血管钙化的发生[8]。因此将高磷作为血管钙化诱导因素对研究 CKD 血管钙化机制具有重要的意义。由于单用磷酸盐造模周期长且模型不稳定,腺嘌呤可以在体内通过黄嘌呤氧化酶生成难以溶解的代谢产物沉积在肾小管和肾小球,破坏肾的滤过功能,影响磷酸盐的排泄,进而加重高磷血症。故本研究采用高磷饮食联合腺嘌呤诱导 CKD 血管钙化大鼠模型,生化结果显示模型组大鼠较对照组肾功能显著下降,血磷及 24 h 尿蛋白定量等显著升高,肾病理提示肾间质纤维化改变,主动脉中膜 α-SMA 表达减少而 RUNX2 表达增加,钙含量明显增加。细胞实验采用 β-GP 刺激大鼠 ASMC,可见随着时间的延长,细胞钙化及成骨样分化越明显。提示成功建立 CKD 血管钙化大鼠模型及 ASMC 钙化模型。

作为真核生物中普遍存在的对细胞内物质及成分进行降解再利用的基本过程,自噬在各种生理和病理过程中均有发生,生理范围内的自噬发挥保护作用,但病理性自噬可能产生过多或过少的活化,参与人体多种病理过程如感染、癌症、神经变性和衰老以及心脏、肝和肾系统等疾病[9]。巨自噬是自噬的经典途径,也是本研究所涉及的自噬类型。在典型的自噬过程中,Beclin 1 与多个分子形成复合体诱导自噬体形成,LC3B 系统参与自噬体的运输和成熟。自噬相关蛋白已经成为疾病干预的新的候选靶标,Beclin 1 及 LC3B 已成为自噬相关蛋白常用的标记物。本研究发现与对照组相比,CKD 血管钙化大鼠主动脉在发生血管钙化及成骨样分化时,存在 LC3B 及 Beclin 1 的表达明显增加。相关性分析结果显示自噬与钙化可能呈正相关关系。曾有研究者在含有 0.9%磷饮食及 0.75%腺嘌呤诱导的大鼠腹主动脉钙化中检测到 LC3B 荧光斑点及 LC3B 蛋白表达增加[10],这与我们的发现一致。为进一步明确自噬在 CKD 血管钙化中的激活情况,本研究通过免疫荧光染色和电镜发现 β-GP 诱导 ASMC 发生钙化同时其 LC3B 表达及自噬小体较对照组明显增多。为证实钙化组是否有自噬流的增强,即 LC3B 或自噬小体的增加不是自噬降解过程障碍所致,而是由于自噬起始过程诱导增强,我们采用监测自噬流的常用方法即用溶酶体抑制剂 CQ 抑制自噬降解过程后观察 LC3BII 蛋白表达情况[11],结果发现 β-GP 可以诱导大鼠动脉平滑肌细胞自噬流增强。这提示血管钙化的同时存在明显的自噬增强。

目前对于自噬增强究竟是促进还是抑制钙化存在争议。既往有研究发现 3-MA 抑制自噬后加剧维生素 D3 和尼古丁诱导的血管壁钙沉积[12];二甲双胍可通过 AMPK-mTOR 途径激活自噬从而减轻 β-GP 诱导的 ASCM 钙化[13]。然而也有研究发现自噬激活可能是尿毒症毒素硫酸吲哚酚诱导 CKD 血管钙化的关键机制之一[14]。黄芪甲甙通过 ERK 抑制自噬并减轻 β-GP 诱导的 ASCM 钙化[15]。自噬增强会促进 AGEs 诱导的人血管平滑肌细胞成骨样转化和凋亡[16]。为了进一步探索自噬在 β-GP 诱导的 ASMC 中的具体作用,本研究通过抑制或者促进自噬,观察其对钙化的影响。通过免疫组化、Western blot、钙含量测定以及茜素红染色等发现 RAP 促进自噬后,高磷刺激下的大鼠 ASMC 的钙沉积减少,钙含量水平明显降低,RUNX2 蛋白表达减少,α-SMA 蛋白表达增多,而 3-MA 抑制自噬后其结果与之相反。这表明自噬参与 β-GP 诱导的动脉平滑肌细胞的钙化及成骨样分化,可能作为一种内源性保护作用的反馈机制而被 β-GP 诱导增强,与既往支持自噬激活可以减轻血管钙化的发现一致。我们推测自噬对血管钙化的抑制作用可能与自噬可降解特异性蛋白有关。既往有研究发现自噬可降解肺动脉平滑肌细胞表面的 BMPR2[17]。Frauscher 等[18]通过体内、体外实验发现自噬主要通过减少 RUNX2 并增加 α-SMA、SM22α 蛋白转录水平从而抑制成骨转分化。此外,自噬可能还与减少释放基质小泡、抑制细胞凋亡等有关[10,19]。

总之,本研究通过体内、外研究发现高磷诱导血管钙化同时存在自噬的激活,自噬的发生与钙化密切相关;自噬在 CKD 血管钙化中可能具有内源性保护作用,增强自噬可以抑制血管钙化,为未来将自噬作为治疗 CKD 患者血管钙化新的手段又增添了一个有力的依据。今后将进一步探讨自噬影响

CKD 血管钙化的具体机制,为血管钙化的防治提供新的思路。

参考文献:

[1] Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, et al. Coronary artery calcification and risk of cardiovascular disease and death among patients with chronic kidney disease [J]. JAMA Cardiol, 2017, 2(6): 635-643 .

[2] Byon CH, Chen Y. Molecular mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease : the link between bone and the vasculature [J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(4): 206-215.

[3] Peng YQ, Xiong D, Lin X, et al. Oestrogen inhibits arterial calcification by promoting autophagy [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3549.

[4] Zhou X, Xu SN, Yuan ST, et al. Multiple functions of autophagy in vascular calcification [J]. Cell Biosci, 2021, 11(1): 159.

[5] Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, et al. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification [J]. Kidney Int, 2014, 85(1): 142-150.

[6] 熊琳, 朱婷婷, 张丽玲, 等. 慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 87-94.

[7] Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 381-387.

[8] Cozzolino M, Ciceri P, Galassi A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(4): 213.

[9] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.

[10] Dai XY, Zhao MM, Cai Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release [J]. Kidney Int, 2013, 83(6): 1042-1051.

[11] Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 1865.

[12] 李艳青, 付佳, 李彤, 等. 内质网应激与自噬的交互作用对血管钙化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(11): 1099-1105.

[13] Qiu X, Xu Q, Xu T, et al. Metformin alleviates β-glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR-activated autophagy [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(1): 58.

[14] Chen J, Gu Y, Zhang H, et al. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced osteoblastic calcification by SET domain containing lysine methyltransferase 7/9 protein [J]. Nephron, 2019, 141(4): 287-294.

[15] Song Z, Wei D, Chen Y, et al. Association of astragaloside IV-inhibited autophagy and mineralization in vascular smooth muscle cells with lncRNA H19 and DUSP5-mediated ERK signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 364: 45-54.

[16] He HQ, Qu YQ, Kwan Law BY, et al. AGEs-induced calcification and apoptosis in human vascular smooth muscle cells is reversed by inhibition of autophagy [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 692431.

[17] Long L, Yang X, Southwood M, et al. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation [J]. Circ Res, 2013, 112(8): 1159-1170.

[18] Frauscher B, Kirsch AH, Schabhuttl C, et al. Autophagy protects from uremic vascular media calcification [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1866.

[19] Ciceri P, Falleni M, Tosi D, et al. Therapeutic effect of iron citrate in blocking calcium deposition in high Pi-calcified VSMC: role of autophagy and apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 5925.

〔收稿日期〕2022-06-16