

自噬参与氧化性低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞钙化

陆立鹤¹, 颜建云^{2*}, 于汇民³, 刘筱霭²

(1.中山大学中山医学院病理生理教研室,广东 广州 510080;2.广州医学院生理教研室,广东 广州 510185;

3. 广东省人民医院心内科//广东省医学科学院广东省心血管病研究所,广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察细胞自噬是否参与了氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞钙化。【方法】采用体外血管平滑肌细胞钙化模型,实验分为3组:control组:用 native LDL 处理细胞;Ox-LDL组:用 Ox-LDL 处理细胞;3MA组:用 Ox-LDL 和 3MA 处理细胞;细胞培养液为 DMEM+10mM BGP。分别以茜素红检测血管钙化,Q-PCR 和 Western blotting 测定 cbfa1 和 Beclin1 的 mRNA 和蛋白表达。【结果】Ox-LDL 加速血管平滑肌细胞钙化,上调 cbfa1 和 Beclin1 的表达;细胞自噬特异性抑制剂 3MA 减弱细胞钙化,下调 cbfa1 和 Beclin1 的表达。【结论】Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化与细胞自噬有关。

关键词: 氧化型低密度脂蛋白;自噬;血管平滑肌细胞;钙化

中图分类号: R364

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)06-0772-04

Autophagy is Involved in Progression of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Induced by Ox-LDL

LU Li-he¹, YAN Jian-yun^{2*}, YU Hui-min³, LIU Xiao-ai²

(1. Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Physiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510185, China; 3. Department of Cardiology, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences and Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To determine whether autophagy is involved in the process of vascular smooth muscle cell calcification induced by Ox-LDL. 【Methods】The in vitro model of vascular calcification was used in this study. Vascular smooth muscle cells were randomly divided into controls, an Ox-LDL-treated group, and a 3MA plus Ox-LDL-treated group. Cells were grown in DMEM supplemented with 10 mM BGP. Calcification was assessed by alizarin red staining. The mRNA and protein expression of cbfa1 and Beclin1 were analyzed by Q-PCR and Western blotting respectively. 【Results】Ox-LDL promotes vascular smooth muscle cell calcification, up-regulates the mRNA and protein expression of cbfa1 and Beclin1. The specific autophagy inhibitor attenuates vascular calcification, and inhibits the up-regulation of cbfa1 and Beclin1 expression induced by Ox-LDL. 【Conclusion】The pathogenesis of vascular smooth muscle cell calcification induced by Ox-LDL involves autophagy.

Key words: oxidized low density lipoprotein; autophagy; vascular smooth muscle cells; calcification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 772-775]

血管钙化广泛地存在于许多疾病过程中,包括动脉粥样硬化,糖尿病,晚期肾病等。临床研究表明血管钙化的程度与心血管疾病的病死率成正相关。近些年来的研究证明,血管钙化是一种受基因调控的主动调节过程,类似骨的生成。大量的刺激因素被证实参与了血管钙化的调控过程^[1]。氧化

性低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)是参与动脉粥样硬化的关键因素。已有实验研究报道 Ox-LDL 能诱导体外牛血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)钙化^[2-3]。然而, Ox-LDL 促使血管平滑肌细胞钙化的机制尚不清楚。细胞死亡是导致血管钙化的机制之一。已

收稿日期: 2010-08-24

基金项目: 国家自然科学基金(81000124);广东省医学科研基金(A2010037)

作者简介: 陆立鹤,博士,讲师, E-mail: lulihel@mail.sysu.edu.cn; *通信作者: 颜建云,博士,讲师, E-mail: yanjy790@gmail.com

有大量研究证实凋亡参与了血管钙化^[4-5]。然而,细胞死亡的另一种方式,自噬是否参与血管钙化尚未见报道。本实验拟采用体外血管平滑肌细胞钙化模型,以细胞自噬特异性抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3MA)作为工具药物,初步研究细胞自噬是否参与了 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化,从而为血管钙化的防治和干预提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养液,FBS 和引物 (Sigma),TRIzol 试剂(Invitrogen),一抗(Santa Cruz),HRP 标记的二抗(Dako),SYBR green detector (Applied Biosystems)。

1.2 细胞培养

人血管平滑肌细胞购于 promocell 公司,置于含 DMEM(100 mL/L FBS)的培养皿中,37℃,5% CO₂ 培养,每周换液 3 次。采用细胞免疫荧光的方法鉴定血管平滑肌细胞:α-SM-actin 作为血管平滑肌细胞的分子标志物。以 10 mmol/L β-甘油磷酸(beta-glycerophosphate, BGP)诱导其钙化。实验分 3 组:control 组;用 native LDL 处理细胞;Ox-LDL 组:用 Ox-LDL 处理细胞;3MA 组:用 Ox-LDL 和 3MA 处理细胞;细胞培养液为 DMEM+10 mmol/L BGP。

1.3 Ox-LDL 的制备

采用梯度密度(1.019 – 1.063 g/mL)超速离心法分离低密度脂蛋白(LDL)。收集健康人的血标本,加入 EDTA 抗凝,4℃下 1 500 ×g 离心 10 min,取上层血浆,加入高密度(1.33 g/mL)KBr 溶液,调整血浆密度至 1.019 g/mL,4℃下超高速离心(541 000 ×g)4 h,去掉最上层极低密度脂蛋白。加入高密度(1.330 g/mL)KBr 溶液,调整样本密度至 1.063 g/mL,4℃下超高速离心(541 000 ×g)4 h,收集最上层即为 native LDL,4℃保存。采用 5 μmol/L CuSO₄ 处理 native LDL 3 h 后可得到 Ox-LDL。

1.4 细胞钙化染色和定量测定

平滑肌细胞去除培养液,PBS 洗 3 次后以 4% 甲醛室温下固定 10 min,PBS 洗后加 20 g/L 茜素红(pH 4.2)染色 5 min,去离子水洗残余颜色,相差显微镜下拍摄钙的沉积。定量测定采用 100 mL/L 甲酸洗涤茜素红染色,然后于 405 nm 处测定吸光度 OD 值。

1.5 荧光定量 PCR

采用 TRIzol 试剂提取血管平滑肌细胞的总 RNA,具体方法参照试剂公司的使用说明。然后使用 DNase I (Roche)纯化提取的 RNA。1 μg RNA 用来逆转录成 cDNA,使用 7900 HT Fast Real-Time PCR system 和 SYBR green detector 进行荧光定量 PCR。β-actin 作为内参,使用 ΔΔCt (threshold cycle) 的方法计算 mRNA 的相对量。荧光定量 PCR 所用的引物如下。β-actin(Forward, F):CCAGCTCACCATGGATGATG, (Reverse, R):GAGCCGTTGTCGACGACG;cbfa1(F):TATGGCACTTCGTCAGGATCC, (R):AATAGCGTGCTGCCATTCG;Beclin1 (F):ACAGTGACAGTTTGGCACA, (R):CGGCAGCTCCTTAGATTGT。

1.6 Western blotting

收集细胞,PBS 漂洗 3 次后,加入细胞裂解缓冲液(200 mmol/L Tris-HCL pH = 8,150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40,10% Glycerol,1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 2 mmol/L Sodium orthovanadate, 100 mg/L PMSF1 mg/L Aprotitin),刮下细胞后,冰上孵育 20 min,4℃下 12 000 ×g 离心,10 min,上清即为总蛋白粗提液。应用 BCA 标准曲线蛋白定量,总蛋白 30 μg 加入等体积 2 × 上样缓冲液混匀后煮沸变性 5 min,在 100 V 电压下,用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,电泳后采用湿转法将蛋白转至硝酸纤维素膜;室温下 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,然后加入一抗(1:500)室温下孵育 2 h,TBST 缓冲液洗涤 3 次;然后加入 HRP 标记的二抗(1:1 000)于室温下共同孵育 1 h;将滤膜转移到 TBST 缓冲液洗涤 3 次;加入 ECL 发光,暗室中胶片显影。

1.7 统计学处理

每次实验重复 3 次,采用 SPSS 软件中的 One-way ANOVA 检验分析数据。 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 Ox-LDL 加速血管平滑肌细胞钙化

Ox-LDL 处理 VSMCs 7 d 后,可开始见钙化(红色区域)出现,14 d 后钙化增强(图 1)。

2.2 3-MA 减轻 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化

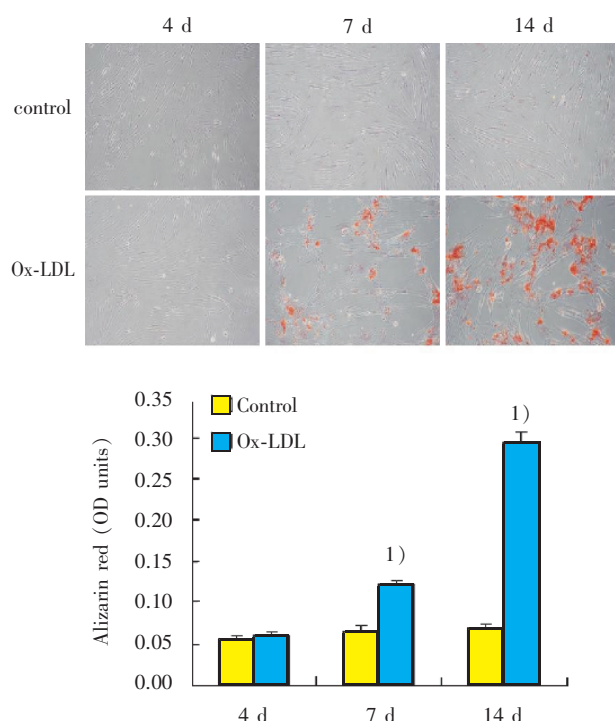


图 1 Ox-LDL 对血管平滑肌细胞钙化的影响

Fig.1 Effect of Ox-LDL on VSMC calcification

Control: cells were cultured in native LDL; Ox-LDL: cells were cultured in Ox-LDL; bar = 200 μ m. 1): Compared with control group, $P < 0.001$.

细胞培养 14 days 后, 细胞自噬特异性抑制剂 3MA 能明显减轻 VSMCs 钙化(图 2)。

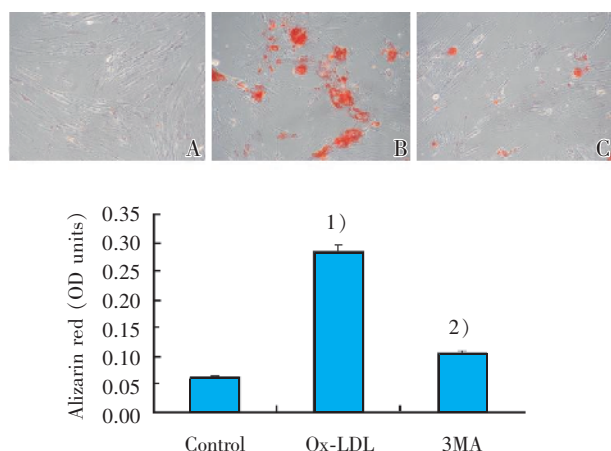


图 2 3MA 对 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化的影响

Fig.2 Effect of 3MA on Ox-LDL-induced VSMC calcification

A: Control, cells were cultured in native LDL; B: Ox-LDL, cells were cultured in Ox-LDL; C: 3MA, cells were cultured in Ox-LDL + 3MA; bar = 200 μ m. 1) Compared with control group; 2) Compared with Ox-LDL group; $P < 0.001$.

2.3 3MA 下调血管平滑肌细胞 cbfa1 和 Beclin1 的表达

细胞培养 14 d 后, Ox-LDL 能上调促使血管平滑肌细胞成骨样变化的关键分子 cbfa1 和参与自噬形成的重要分子 Beclin1 的表达, 而细胞自噬特异性抑制剂 3MA 能明显减轻 cbfa1 和 Beclin1 的表达上调(图 3)。

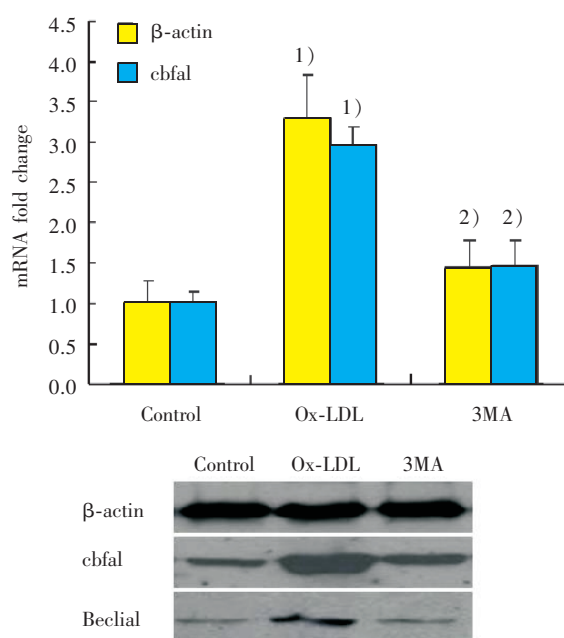


图 3 3-MA 对血管平滑肌细胞 cfa1 和 Beclin1 表达的影响

Fig.3 Effect of 3MA on the expression of cbfa1 and Beclin1 in VSMCs

Control: cells were cultured in native LDL; Ox-LDL: cells were cultured in Ox-LDL; 3MA: cells were cultured in Ox-LDL + 3MA. 1): Compared with control group; 2): Compared with Ox-LDL group; $P < 0.01$.

3 讨 论

血管钙化是受基因调节的主动病变过程。在钙化诱导因子如的作用下, 成骨分化转录因子如 cbfa1 等表达上调, 血管平滑肌细胞可分化为成骨样细胞, 分泌大量的骨相关蛋白。另外, 血管平滑肌细胞可发生死亡, 释放基质小体, 形成钙化中心, 最终促使血管钙化的形成^[6]。本研究发现: Ox-LDL 能加速血管平滑肌细胞钙化, 上调细胞自噬调节基因 Beclin1 的表达, 而细胞自噬特异性抑制剂 3MA 能减轻 Ox-LDL 诱导的细胞钙化, 并下调

Beclin1 的表达。

Ox-LDL 是促进心血管疾病的主要病理基础动脉粥样硬化发展的关键因素。Ox-LDL 在动脉粥样硬化形成过程发挥了关键的作用:包括内皮功能损伤,泡沫细胞形成,炎症的发生等。血管钙化是动脉粥样硬化晚期的重要特征,已有体外实验证实 Ox-LDL 能促进牛血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化^[2-3]。Parhami 等^[2]发现:Ox-LDL 能剂量依赖性地提高血管平滑肌细胞成骨样分化分子标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性,并诱导血管平滑肌细胞的钙化。Bear^[3]等发现 Ox-LDL 能通过上调成骨分化转录因子 cbfa1 的表达,从而加速牛血管平滑肌细胞的成骨样分化和钙化。同样,我们的实验结果也证实了 Ox-LDL 呈时间依赖性地加速人血管平滑肌细胞钙化,并且上调成骨分化转录因子 cbfa1 的表达。

自噬是一种细胞降解的生物学过程,有别于凋亡的另一种程序性细胞死亡方式,是部分粗面内质网的无核糖体附着区的双层膜脱落下来,包裹部分胞浆和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分,形成自噬小体。Beclin1 是参与细胞自噬的重要调节基因^[7]。细胞自噬广泛存在于许多疾病包括神经退行性疾病(如阿尔兹海默病、帕金森病等)、癌症、心脏疾病等。大量的研究证据表明自噬存在于晚期动脉粥样斑块中^[8-9]。在钙化的瓣膜中能检测到自噬细胞^[10]。体外实验提示导致血管平滑肌细胞死亡或损伤的因素很可能诱导或加速血管钙化。因此,细胞自噬很可能同凋亡一样,也参与了动脉粥样硬化和血管钙化的形成。另外, Ox-LDL 能通过调节自噬相关基因 Beclin-1 的表达诱导细胞自噬^[11]。本研究采用 3MA 作为自噬特异性抑制剂来研究自噬在 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞钙化中的作用。3MA 明显地减轻了 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化;同时能抑制 Ox-LDL 诱导的 cbfa1 和 Beclin1 表达上调。这些结果提示自噬参与了 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化。然而,细胞自噬致使血管平滑肌细胞钙化的准确机制需要进一步的研究。

综上所述,我们的结果表明:细胞自噬,不同于凋亡的另一种细胞程序性死亡参与了 Ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞钙化。Ox-LDL 很可能通过上调 Beclin1 基因的表达,促使细胞自噬的发生,最终导致血管平滑肌细胞钙化。3MA 通过下调

Beclin1 基因的表达,从而阻断这一钙化过程的发生。

参考文献:

- [1] 陆立鹤,刘 兰,谭红梅,等. Biglycan 对地塞米松诱导血管平滑肌细胞钙化的作用[J]. 中山大学学报:医学科学版,2009,30(3):255-258,263.
- [2] Parhami F, Morrow A D, Balucan J, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(4): 680-687.
- [3] Bear M, Butcher M, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with beta-glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells [J]. J Cell Biochem, 2008, 105(1): 185-193.
- [4] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies [J]. Circ Res, 2000, 87(11): 1055-1062.
- [5] Shroff RC, McNair R, Figg N, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis [J]. Circulation, 2008, 118(17): 1748-1757.
- [6] Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification [J]. J Intern Med. 2006, 260(3): 192-210.
- [7] Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure [J]. Int J Cardiol, 2009, 134(1): 82-90.
- [8] Jia G, Cheng G, Agrawal DK. Autophagy of vascular smooth muscle cells in atherosclerotic lesions [J]. Autophagy, 2007, 3(1): 63-64.
- [9] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. Circ Res, 2009, 104(3): 304-317.
- [10] Mistiaen WP, Somers P, Knaapen MW, et al. Autophagy as mechanism for cell death in degenerative aortic valve disease [J]. Autophagy, 2006, 2(3): 221-223.
- [11] Zabirnyk O, Liu W, Khalil S, et al. Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 446-454.

(编辑 孙慧兰)