

钙调神经磷酸酶对钙化细胞 I 型三磷酸肌醇受体表达的影响

李芳, 李绍冰¹, 苑晓烨, 姚丽霞, 田一帆, 冯会英, 李秀芹, 孙鹏
(河北省人民医院老年病科, 河北省石家庄市 050051)

[关键词] 细胞钙化; 钙调神经磷酸酶; I 型三磷酸肌醇受体; 环孢素 A

[摘要] 目的 探讨大鼠血管平滑肌细胞钙化过程中钙调神经磷酸酶对 I 型三磷酸肌醇受体蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞经传代培养后随机分为对照组、钙化组和环孢素 A 组, 采用磷酸二氢钠诱导大鼠动脉血管平滑肌细胞钙化。应用免疫印迹法及实时荧光定量 RT-PCR 法测定钙调神经磷酸酶 B 亚基、I 型三磷酸肌醇受体的表达变化, 同时测定 Ca^{2+} 浓度及碱性磷酸酶、钙调神经磷酸酶活性。结果 与对照组比较, 钙化组钙调神经磷酸酶 B 亚基、I 型三磷酸肌醇受体蛋白和 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与钙化组比较, 环孢素 A 组钙调神经磷酸酶 B 亚基、I 型三磷酸肌醇受体蛋白和 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。钙化组 Ca^{2+} 浓度、钙调神经磷酸酶活性、碱性磷酸酶活性较对照组显著增高 ($P < 0.01$); 环孢素 A 组碱性磷酸酶活性、 Ca^{2+} 浓度较钙化组显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 钙调神经磷酸酶活性较钙化组显著降低 ($P < 0.01$)。结论 钙调神经磷酸酶能够增强钙化细胞中 I 型三磷酸肌醇受体 mRNA 和蛋白的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Regulation of Expression of 1, 4, 5 Trisphosphate Receptor I by Calcineurin in Cellular Calcification

LI Fang, LI Shao-Bing, YUAN Xiao-Ye, YAO Li-Xia, TIAN Yi-Fan, FENG Hui-Ying, LI Xiu-Qin, and SUN Peng
(Department of Gerontology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Cell Calcification; Calcineurin; 1,4,5-Trisphosphate Receptor I; Cyclosporin A

[ABSTRACT] **Aim** To explore the modification of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type I (IP3R I) expression by calcineurin in calcification of vascular smooth muscle cells. **Methods** Rat aortic vascular smooth muscle cells after subculture were randomly divided into control group, calcification group and cyclosporine A (CsA) group. Rat aortic vascular smooth muscle cell calcification model was constructed by NaH_2PO_4 . Expression of IP3R I and calcineurin was determined by RT-PCR and Western blot methods. Alkaline phosphatase (ALP) Activity and Ca^{2+} concentration were determined by colorimetric method. CaN activity was determined by ELISA. **Results** Expressions of IP3R I and CaNB mRNA and protein increased in calcification group compared with control group ($P < 0.01$). Expressions of IP3R I and CaNB mRNA and protein decreased in CsA group compared with calcification group ($P < 0.01$). Ca^{2+} concentration and CaN and ALP activities of rat aortic smooth muscle cells increased in calcification group compared with control group ($P < 0.01$). ALP activity and Ca^{2+} concentration increased in CsA group compared with calcification group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CaN activity decreased in CsA group compared with calcification group ($P < 0.01$). **Conclusions** CaN can enhance the expression of IP3R I mRNA and protein in cell calcification.

血管钙化是许多心脑血管系统疾病及慢性肾病、衰老等普遍存在的病理表现, 主要表现为血管壁顺应性降低及僵硬性增加, 易引发血栓形成及斑块破裂, 导致心肌肥厚、心肌梗死、脑梗死和心力衰竭等, 是心血管事件、脑卒中和外周血管病发生的重要

标志分子。

哺乳动物细胞包含两个 Ca^{2+} 胞内钙释放通道, 即三磷酸肌醇受体 (IP3R) 和雷尼丁受体 (RyR), 其中 IP3R 至少包含 I、II、III 型。血管平滑肌细胞 (VSMC) 表达大量 IP3R I, 而 IP3R II、IP3R III 则表

[收稿日期] 2011-04-01

[作者简介] 李芳, 副主任医师, 主要从事老年心血管病研究。苑晓烨, 硕士, 主治医师, 主要从事老年心血管病研究。通讯作者李绍冰, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事老年心血管病研究。

达局限。钙调神经磷酸酶 (CaN) 是迄今所知的唯一受 Ca^{2+} /钙调素调节的蛋白磷酸酶,由调节亚基 B (CaNB) 和催化亚基 A (CaNA) 组成的异源二聚体, CaN 分布广泛,通过对底物去磷酸化,参与多种细胞功能调节。目前研究已发现在 VSMC 增殖过程中, CaN 能够负反馈调节细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,并且在转录水平和翻译水平调节 IP3R I 的表达^[1,2]。但是在细胞钙化过程中 CaN 对 IP3R 是否有调节作用目前国内外尚未见报道。本研究初步探讨钙化细胞中 CaN 对 IP3R I 的调节作用,为细胞钙化的临床防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

NaH_2PO_4 购自天津市永文化学试剂开发中心;碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒购于南京建成生物公司; Ca^{2+} 定量检测试剂盒购于上海沪峰科技有限公司; IP3R I 检测试剂盒 (sc-28614) 购于 Santa Cruz 公司,随机引物为美国 Promega 公司产品。

1.2 分组

大鼠胸主动脉 VSMC (A7:5) 购于中科院上海细胞库,经传代培养后随机分为三组:对照组、钙化组和环孢素 A (CsA) 组。实验第 1~6 天将细胞培养至长满瓶底,测细胞密度为 $10^6/\text{mm}^2$,参照文献 [3],对照组给予正常对照的 DMEM 培养基 3 mL,钙化组给予 NaH_2PO_4 配制浓度为 2 mmol/L 的 DMEM 培养基 3 mL, CsA 组给予 NaH_2PO_4 配制浓度为 2 mmol/L 的 DMEM 培养基 3 mL 同时加入浓度为 5 mg/L CsA 30 μL 。

1.3 大鼠主动脉 VSMC 的茜素红染色

参照文献 [4],12 孔板中置入玻片,将细胞均匀接种于 12 孔板中,正常培养 6 天后,细胞均匀贴壁,三组分别给予不同的培养基培养,每 3 天换液 1 次,培养 6 天。移液器吸去上清,PBS 冲洗 2 遍,加入 4% 甲醛溶液于 4℃ 冰箱中过夜,后用 PBS 冲洗 2 遍,加入茜素红染色,37℃ 温箱中赋育 30 min,弃茜素红染料,PBS 冲洗 2 遍,将玻片取出,置于载玻片上,观察 VSMC 的形态学改变。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测

IP3RI 引物序列上游为 5'-ACC AGT TGG CTC GGC ATA-3',下游为 5'-TGG GCA CAG GGA AGA CAA-3'; CaNB 引物序列上游为 5'-GGG CAA CCC TGA AAG ATA CG-3',下游为 5'-ACA ACA GCA CAG

AAC TCC TCA-3'。将标本加入逆转录反应液中,42℃ 逆转录 50 min,95℃ 5 min 灭活逆转录酶。再将逆转录产品加入 PCR 反应液中,PCR 热循环参数:96℃ 4 min,94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,进行 40 个循环,于每个循环的第三步收集荧光信号。以 GAPDH 为内参照基因,与对照组相比得到目的基因表达的相对定量值 (RQ 值),将 RQ 值用于统计学分析。

1.5 Western blot 检测

将离心管中的细胞加入 RIPA 裂解液匀浆,冰浴反应 30 min,4℃、8000 r/min 离心 10 min,取上清加入 PMSF 调至终浓度为 1%, -20℃ 保存。取少量蛋白提取液,以牛血清白蛋白为标准物,采用改良酚试剂法,检测其中总蛋白含量。并转移至 PVDF 膜上,应用 5% 脱脂奶粉封闭,随后置于一抗中。室温洗膜,共 3 次。之后置入二抗溶液中,抗体结合区带用化学发光法检测定量值 (IOD 值),将 IOD 值用于统计学分析。

1.6 ELISA 测定大鼠主动脉 VSMC CaN 活性

分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、对照孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μL ,待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL ,然后再加待测样品 10 μL (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。

1.7 比色法测定大鼠主动脉 VSMC Ca^{2+} 浓度

每组设 6 个复孔。弃去细胞培养液,PBS 洗 3 次,加入 0.6 mol/L 盐酸,37℃ 孵育 24 h 脱钙,吸取上清,比色法测定钙含量。培养物用 PBS 洗 3 次,加入 0.1 mol/L NaOH 或 1 g/L SDS,30 min 后取上清液,比色法测细胞蛋白含量。用细胞钙含量比蛋白含量得到培养细胞钙沉积的浓度 (mmol/mg)。

1.8 比色法测定大鼠主动脉 VSMC ALP 活性

根据试剂盒说明,弃去细胞培养液,细胞用 PBS 洗 3 遍,加入 500 μL 裂解液,移至预冷的 Eppendorf 管,强力震荡 15 s,37℃ 孵育 30 min,分光光度计 (波长 405 nm) 测定吸光值,ALP 活性用 ρ -硝基苯酚为标准值计算,1 单位表示 30 min 内产生 1 nmol/L 硝基苯酚的活性。

1.9 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先对计量资料进行正态性检验及方差齐性检验,组间资料比较应用单因素方差分析,两两比较应用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 VSMC 的形态学改变

茜素红染色后,对照组大鼠 VSMC 呈梭形,排列整齐,未见钙化点;钙化组 VSMC 呈梭形或多角形,排列紊乱,胞浆内可见褐色钙化点;CsA 组 VSMC 呈梭形或多角形,排列紊乱,胞浆内可见大量褐色钙化点。

2.2 大鼠 VSMC Ca²⁺ 含量

钙化组和 CsA 组 Ca²⁺ 含量较对照组显著增加 ($P < 0.01$),CsA 组 Ca²⁺ 含量较钙化组显著增加 ($P < 0.05$;表 1)。

2.3 大鼠 VSMC ALP 活性

钙化组和 CsA 组 ALP 活性较对照组显著增高 ($P < 0.01$),CsA 组 ALP 活性较钙化组显著升高 ($P < 0.01$;表 1)。

2.4 大鼠 VSMC CaN 活性

钙化组 CaN 活性较对照组显著增加 ($P < 0.01$),CsA 组 CaN 活性较钙化组显著减低 ($P < 0.01$),CsA 组 CaN 活性与对照组相比差异无显著

性(表 1)。

2.5 大鼠 VSMC CaNB 蛋白和 mRNA 表达

钙化组和 CsA 组 CaNB 蛋白和 mRNA 表达较对照组显著增加 ($P < 0.01$),CsA 组 CaNB 蛋白和 mRNA 表达较钙化组显著减少 ($P < 0.01$;表 2 和图 1)。

2.6 大鼠 VSMC IP3R I 蛋白和 mRNA 表达

钙化组和 CsA 组 IP3R I 蛋白和 mRNA 表达较对照组显著增加 ($P < 0.01$),CsA 组 IP3R I 蛋白和 mRNA 表达较钙化组显著减少 ($P < 0.01$;表 2 和图 1)。

表 1. 大鼠主动脉 VSMC Ca²⁺ 含量、ALP 和 CaN 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1. Ca²⁺ concentration, ALP and CaN activities in rat aortic VSMC

分 组	Ca ²⁺ (mol/g)	ALP(U/g)	CaN (IU/L)
对照组	6.03 ± 0.33	38.74 ± 2.23	14.31 ± 0.24
钙化组	9.01 ± 0.32 ^a	146.04 ± 9.02 ^a	21.47 ± 1.86 ^a
CsA 组	10.39 ± 0.70 ^{ab}	216.69 ± 14.0 ^{ac}	15.34 ± 0.14 ^c

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与钙化组比较。

表 2. 大鼠主动脉 VSMC CaNB 和 IP3R I 的蛋白及 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. Expression of CaNB and IP3R I protein and mRNA in rat aortic VSMC

分 组	CaNB 蛋白	CaNB mRNA	IP3R I 蛋白	IP3R I mRNA
对照组	29.9 ± 1.39	1.10 ± 0.28	397.87 ± 39.94	1.02 ± 0.15
钙化组	69.11 ± 2.51 ^a	6.27 ± 1.45 ^a	1865.40 ± 128.57 ^a	5.90 ± 1.41 ^a
CsA 组	48.22 ± 2.47 ^{ab}	3.38 ± 0.77 ^{ab}	1155.10 ± 71.42 ^{ab}	2.58 ± 0.53 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与钙化组比较。

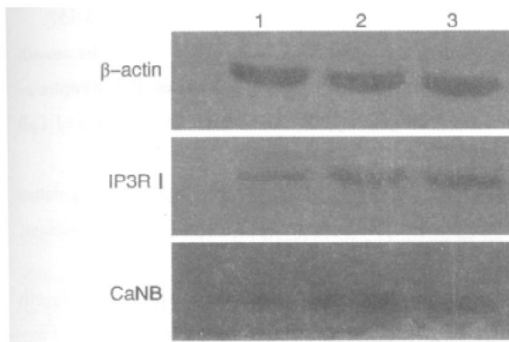


图 1. 大鼠主动脉 VSMC IP3R I 和 CaNB 的蛋白表达
1 为对照组,2 为钙化组,3 为 CsA 组。

Figure 1. Expression of CaNB and IP3R I protein in rat aortic VSMC

3 讨论

血管钙化多发生于血管壁的中膜和内膜。中膜

钙化与弹性蛋白和 VSMC 有关,而内膜钙化多与脂质、巨噬细胞和血管平滑肌有关,两种钙化均包括钙化调节蛋白在局部的表达和基质小泡/凋亡小体的生成等。既往研究认为血管钙化是一个被动过程^[5],是与衰老伴行的退行性病变,是血管老化的标志,然而,新近的研究发现血管钙化形成的早期过程是复杂的、主动的、可预防和可逆转的高度可调控的生物学过程,是活跃的血管结构的骨化,类似于骨和软骨形成过程中的骨化,且老年血管钙化常与骨质疏松伴行。流行病学、细胞生物学、分子生物学、影像学和遗传学的研究均表明二者的发病具有共同的机制。而 VSMC 是联系骨代谢和血管钙化的细胞学基础之一,血管的管壁细胞尤其是 VSMC 在一些诱导条件下均可转变为具有合成和分泌功能的成骨细胞样表型,能合成和分泌多种骨形成蛋白如骨钙蛋白、ALP、骨连接素和骨桥蛋白(OPN)等,在细胞外基质或胞质中形成钙结节^[6,7]。

本研究中,钙化组 VSMC 呈梭形或多角形,排列紊乱,胞浆内可见褐色钙化点,其 CaN、ALP 活性、Ca²⁺ 浓度显著增强,提示细胞钙化成功,同时 IP3R I 和 CaNB 的蛋白及 mRNA 表达显著增加,说明 CaN 及 IP3R I 均参与了细胞钙化的调节过程。IP3 作为细胞内钙激动剂,与内质网上的 IP3R (实际上是 Ca²⁺ 通道) 结合,使钙通道活化、开放,大量 Ca²⁺ 从钙库内迅速释放,使胞质内的 Ca²⁺ 浓度迅速升高。IP3 作为细胞内与钙信号相关的第二信使,与 IP3R 结合可以调控细胞内钙释放。本研究发现,钙化细胞内 IP3R I 的表达异常升高,从而导致钙代谢异常,细胞钙化出现的钙超载其重要原因之一可能是细胞内 IP3R 出现异常所致。CaN 是直接受 Ca²⁺ 活化的多功能信号酶,它可通过去磷酸化作用介导、调节多条信号传导通路,协同调节细胞的各项功能。活化 CaN 最重要的底物是 T 细胞核因子 (NFAT) 家族成员。细胞的增殖、凋亡、基因表达、黏附和迁移等都与细胞内 Ca²⁺ 浓度有关, CaN 可通过其去磷酸化作用调节 Ca²⁺ 通道的关闭,影响胞内 Ca²⁺ 浓度,调控 VSMC 增殖、凋亡、心肌肥厚等功能活动。目前研究已发现, VSMC FKBP12 蛋白通过 CaN 抑制 IP3R 调控 Ca²⁺ 释放^[8]; IP3R 活性同时受钙调蛋白的调控^[9]; 而在 VSMC 增殖过程中, CaN 能够负反馈调节细胞内游离 Ca²⁺ 浓度^[1], 并且在转录水平和翻译水平调节 IP3R I 的表达^[2]。此外, IP3R 基因的转录受细胞浆游离钙浓度变化的调节^[2]。

本研究在钙化程度相同的细胞中加入 CaN 特异性抑制剂 CsA 阻断 CaN 活性后, VSMC 中 IP3R I 和 CaNB 蛋白及 mRNA 的表达显著减少, 推测 CaN 可能增强 IP3R I 的表达。已有研究发现, 体内 CaN 可使 IP3R II 去磷酸化关闭, 进而影响心肌细胞内 Ca²⁺ 的释放, 在成熟的心肌细胞内第二信使 IP3 直接参与 NFAT 的激活^[10], 在免疫系统 IP3 同样参与 CaN、NFAT 的激活^[11]。而在钙化细胞中 CaN 被激活后, 受磷蛋白 phospholamban (PLB) 可通过去磷酸化过程而被活化, 肌浆网上 Ca-ATP 酶的活性被 PLB 抑制, 其结果导致细胞浆内 Ca²⁺ 浓度明显升高^[12], Ca²⁺ 促使 IP3 产生, 从而增强 IP3R I 的表达, 加重钙代谢异常, 导致钙超载。当用特异性抑制物 CsA 阻断 CaN 活性后, 上述过程被抑制, 从而使 IP3R I 表达明显下降。

本研究仅对 CaN 及 IP3R I 在细胞钙化中的作

用进行了基础研究, 同时对细胞钙化中 CaN 对 IP3R I 的影响进行了初步探索, 仍有许多问题需要去研究和解答。例如钙化细胞中 CaN 及 IP3R I 更为详细的作用机制是什么? CaN、IP3R I 表达和活性增加究竟是钙化的原因还是失代偿的结果? 尽管如此, 本研究仍为临床防治细胞钙化提供了一个新的靶点, 为深入研究细胞钙化的调节机制提供了一个新的方向。相信在不久的将来有效防治细胞钙化的策略一定会被发现, 并应用到临床。

【参考文献】

- [1] Afroze T, Yang LL, Wang C, et al. Calcineurin-independent regulation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase in the vascular smooth muscle cell cycle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285: C88-95.
- [2] 李世军, 孙宁玲. 血管平滑肌细胞增殖过程中钙调神经磷酸酶对三磷酸肌醇受体 I 型表达的调节 [J]. *高血压病杂志*, 2006, 14 (2): 139-142.
- [3] 战晓丽. 高磷对血管平滑肌细胞钙化的影响及阿托伐他汀干预防效应的研究 [D]. 第二军医大学, 2007 级硕士学位论文.
- [4] 刘婷, 赵立玲, 谢辉, 等. 脂联素对主动脉平滑肌细胞体外钙化的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20 (19): 2 910-913.
- [5] Kosaku Nitta. Screening of vascular calcification in hemodialysis patients [J]. *Intern Med*, 2010, 49 (24): 2 657-658.
- [6] 齐永芬. 重视对血管钙化的基础研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2004, 6 (5): 358-360.
- [7] 段晓辉, 齐永芬, 唐朝枢. 血管钙化动物模型的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (2): 153-157.
- [8] MacMillan D, Currie S, Bradley KN, et al. In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP3 receptor-evoked Ca²⁺ release by mTOR and calcineurin [J]. *J Cell Sci*, 2005, 18 (23): 5 443-451.
- [9] Taylor CW, Laude AJ. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺ [J]. *Cell Calcium*, 2002, 32 (5-6): 321-334.
- [10] Rinne A, Blatter LA. Activation of NFATc1 is directly mediated by IP3 in adult cardiac myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299 (5): H1 701-707.
- [11] 姜涛, 张颖. 钙调神经磷酸酶的研究新进展 [J]. *中国社区医师*, 2007, 9 (7): 3.
- [12] Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP [J]. *Circ Res*, 2003, 93: 1 034-046.

(此文编辑 文玉珊)