

同型半胱氨酸通过内质网应激反应促进大鼠血管平滑肌细胞钙化

侯跃龙^{1,3}, 陆薇薇^{1,3}, 张金胜^{1,3}, 倪先强^{1,3}, 鱼艳荣^{1,3}, 唐朝枢^{1,2}, 齐永芬^{1,2,3}

(1. 北京大学基础医学院生物活性小分子研究室; 2. 北京大学医学部分子心血管学教育部重点实验室;

3. 北京大学基础医学院病原生物学系, 北京市 100191)

[关键词] 同型半胱氨酸; 血管钙化; 内质网应激; 血管平滑肌细胞

[摘要] **目的** 研究同型半胱氨酸(Hcy)对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)钙化的影响及其可能的机制。**方法** Hcy、内质网应激抑制剂 4 苯基丁酸(PBA)和牛磺酸(TAU)处理 VSMC, 茜素红染色、钙含量和碱性磷酸酶(ALP)活性测定确定细胞钙化; Western Blot 检测其内质网应激相关蛋白表达。**结果** 不同浓度的 Hcy (50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$) 促进 VSMC 钙化, 与钙化组相比, VSMC 钙含量分别增加了 2.5 倍、4.17 倍、5.83 倍和 8.33 倍(均 $P < 0.05$), ALP 活性分别增加了 1.56 倍、2.18 倍、2.56 倍和 3.13 倍(均 $P < 0.05$)。Hcy 可以促进内质网应激相关蛋白表达增加, 与钙化组相比, 给予 Hcy 后, p-PERK、p-IRE1 和 ATF6 分别升高了 37.8%、27.5% 和 26%(均 $P < 0.05$)。给予 PBA 和 TAU 后, Hcy 所诱导的内质网应激相关蛋白表达增加被抑制, 与钙化 + Hcy 组相比, p-PERK 降低 64% 和 76%(均 $P < 0.01$)、p-IRE1 降低 65% 和 41.1%(均 $P < 0.01$)、ATF6 降低 50% 和 47%(均 $P < 0.01$)、CHOP 降低 47.4% 和 39.5%(均 $P < 0.01$)、PERK 降低 58.6% 和 69%(均 $P < 0.01$)、GRP78 降低 79.5% 和 72.7%(均 $P < 0.01$)。应用内质网应激抑制剂 PBA 和 TAU 可抑制 Hcy 诱导的 VSMC 钙化, 茜素红染色发现钙化结节减少、ALP 活性和钙含量降低; PBA 和 TAU 还可抑制 Hcy 刺激的 VSMC 由收缩表型向成骨样细胞表型转变, 与钙化 + Hcy 组相比, PBA 和 TAU 处理组 SM α -actin 分别升高了 2.9 倍和 3.1 倍(均 $P < 0.01$)、SM22 α 分别升高了 1.8 倍和 2.3 倍(均 $P < 0.01$)、OPN 分别降低了 2.73 倍和 4.2 倍(均 $P < 0.01$)。**结论** Hcy 通过激活 VSMC 内质网应激反应促进 VSMC 钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Homocysteine Exacerbates Rat Vascular Smooth Muscle Cells Calcification by Activating Endoplasmic Reticulum Stress

HOU Yue-Long^{1,3}, LU Wei-Wei^{1,3}, ZHANG Jin-Sheng^{1,3}, NI Xian-Qiang^{1,3}, YU Yan-Rong^{1,3}, TANG Chao-Shu^{1,2}, and QI Yong-Fen^{1,2,3}

(1. Laboratory of Cardiovascular Bioactive Molecule, School of Basic Medical Sciences, Peking University; 2. Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences, Ministry of Education, Peking University Health Science Center; 3. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Vascular Calcification; Endoplasmic Reticulum Stress; Vascular Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and the possible mechanism of homocysteine (Hcy) on vascular smooth muscle cells (VSMC) calcification. **Methods** VSMC were treated with Hcy, endoplasmic reticulum stress (ERS) inhibitors 4-Phenylbutyric acid (PBA) and taurine (TAU). Alizarin red staining, calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity assay were used to determine VSMC calcification. Western Blot was used to measure the protein expression of endoplasmic reticulum stress (ERS) markers. **Results** Hcy with different concentration (50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) can exacerbate VSMC calcification. Compared with the calcification group, calcium content of VSMC was increased by 2.5-fold ($P < 0.01$), 4.17-fold ($P < 0.01$), 5.83-fold ($P < 0.05$) and 8.33-fold ($P < 0.01$) respectively, the ALP activity, was elevated by

[收稿日期] 2015-01-16

[修回日期] 2015-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金(91339203, 81270407)和教育部博士研究生导师基金(20110001110012)资助

[作者简介] 侯跃龙, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的发病机制, E-mail 为 houyue365@126.com。通讯作者齐永芬, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管活性多肽的生理和病理生理意义及血管钙化的发病机制, E-mail 为 yongfenqi@163.com。

1.56-fold ($P < 0.05$), 2.18-fold ($P < 0.05$), 2.56-fold ($P < 0.01$), and 3.13-fold ($P < 0.01$), respectively. Hcy could increase expression of ERS markers, p-PERK, p-IRE1, and ATF6 were increased by 37.8%, 27.5%, and 26% (All $P < 0.05$) respectively, compared with calcification group alone. PBA and TAU inhibited the increase in ERS related proteins which induced by Hcy, compared with Hcy group, p-PERK decreased 64% and 76% (both $P < 0.01$), p-IRE1 decreased 65% and 41.1% (both $P < 0.01$), ATF6 decreased 50% and 47% (both $P < 0.01$), CHOP decreased 47.4% and 39.5% (both $P < 0.01$), PERK decreased 58.6% and 69% (both $P < 0.01$), GRP78 decreased 79.5% and 72.7% (both $P < 0.01$) treated with PBA and TAU. ERS inhibitor PBA and TAU could inhibit VSMC calcification induced by Hcy, calcification node, ALP activity and calcium content were reduced by PBA and TAU. In addition, PBA and TAU also blocked the VSMC contractile phenotype transforming into to osteoblast-like phenotype induced by Hcy. Compared with Hcy group, SM α -actin increased by 2.9-fold and 3.1-fold (both $P < 0.01$), SM22 α increased by 1.8-fold and 2.3-fold (both $P < 0.01$), OPN decreased by 2.73-fold and 4.2-fold (both $P < 0.01$) by PBA and TAU respectively.

Conclusion Hcy exacerbates VSMC calcification via activation of the ERS.

血管钙化是指钙盐在血管壁的正常沉积,是一种由细胞介导的可调控的生物学过程,多种因素均可参与促进血管钙化的形成,包括钙磷代谢紊乱、炎症、氧化应激、凋亡、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)等^[1]。内质网是细胞内蛋白质合成折叠、Ca²⁺储存和脂质合成的主要位点,当内质网稳态出现紊乱时,大量未折叠或错误折叠蛋白在内质网中聚集所产生的应激反应,称为ERS。当ERS发生时,内质网分子伴侣蛋白,如葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78kDa, GRP78)表达水平增加,与内质网膜上的三种应激感受器蛋白, RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)、需肌醇酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)和激活转录因子6(activating transcription factor-6, ATF6)解离,并与未折叠蛋白结合,以促进蛋白质的正确折叠,而与GRP78解离后的PERK、IRE1和ATF6分别被激活,启动ERS的三条主要信号通路,进而调节ERS反应相关基因的转录^[2-3]。当ERS过强或持续时间过长时,可以促进促凋亡分子如CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、Caspase-12和C-Jun氨基酸末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)的表达增加,诱导细胞凋亡的产生^[4]。我们和国外实验室均发现ERS的激活可促进血管钙化的发生和发展^[5-7]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是甲硫氨酸去甲基后形成的一种含硫氨基酸。临床研究表明,当血清中Hcy浓度超过正常范围(5~15 $\mu\text{mol/L}$, 高同型半胱氨酸血症)可导致多种心血管疾病(如动脉粥样硬化和血栓形成)的发病率增加^[8]。研究证明, Hcy可以促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)钙化^[9],还可以诱导血管中成骨样细胞分化的增加^[10]。近期的研究表明, Hcy可以激活血

管内皮细胞^[11-12]、心肌细胞^[13]以及VSMC中ERS的激活^[14]。但Hcy是否通过激活VSMC中的ERS进而促进VSMC钙化目前尚不清楚。本实验在离体培养的大鼠VSMC上研究Hcy在VSMC钙化形成过程中的作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SD大鼠由北京大学医学部动物实验中心提供。 β -磷酸甘油、Hcy、4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, PBA)、牛磺酸(taurine, TAU)、茜素红均为Sigma产品。钙含量检测试剂盒购自北京中生北控公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒购自南京建成生物公司。DMEM购自Gibco公司,胎牛血清购自Hyclone公司。平滑肌(smooth muscle, SM) α -actin、 β -actin、GAPDH、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)一抗和所有的二抗都购自于Santa Cruz生物科技公司。GRP78、p-IRE1/IRE1、p-PERK/PERK、ATF6、SM22 α 和CHOP的抗体购自Abcam公司。余为市售分析纯产品。

1.2 大鼠VSMC培养

无菌取SD大鼠胸主动脉中膜,去除外膜和内膜后,剪成1 mm³小块置于含20%胎牛血清的DMEM培养基中,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的孵箱中进行原代培养。实验采用第3~8代细胞。取处于融合状态的VSMC,在含10%胎牛血清、1 $\times 10^5$ U/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养基中按1 $\times 10^5$ 个/孔接种于12孔培养板培养,分别进行后续实验。

1.3 钙化VSMC的制备及分组

(1)对照组:用DMEM培养基(含10%胎牛血清、1 $\times 10^5$ U/L青霉素、100 mg/L链霉素)培养;每2~3天换液1次,连续培养14天。(2)钙化组:用

钙化培养基(DMEM 培养基中加入 10 mmol/L β -磷酸甘油),每 2~3 天换液 1 次,连续培养 14 天,以制备钙化的 VSMC。(3)钙化 + Hcy 组:10 mmol/L β -磷酸甘油分别加终浓度为 50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy;每 2~3 天换液 1 次,连续培养 14 天。(4)钙化 + Hcy + PBA 组:加入 β -磷酸甘油培养液和 Hcy 前 30 min,在培养基中加入终浓度为 5 mmol/L 的 PBA 进行预处理;每 3 天换液 1 次,连续培养 14 天。(5)钙化 + Hcy + TAU 组:加入 β -磷酸甘油培养液和 Hcy 前 30 min,在培养基中加入终浓度为 10 mmol/L 的 TAU 进行预处理,每 3 天换液 1 次,连续培养 14 天。

1.4 茜素红染色

培养的 VSMC 用含 4% 甲醇的 PBS 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 45 min,双蒸水洗 3 次,然后用 1% 茜素红溶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,弃去茜素红溶液,双蒸水洗 3 次后在相差显微镜下检查 VSMC 钙化情况^[15]。

1.5 钙含量测定

每孔细胞用 PBS 洗 3 次,0.6 mol/L 盐酸脱钙 24 h 后收取细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 13000 r/min 离心 10 min,取上清用钙含量试剂盒进行检测(中生北控公司),分别测定 $A_{\text{标准}}$ 和 $A_{\text{样品}}$ 。计算钙浓度 = $A_{\text{标准}}/A_{\text{样品}} \times$ 标准品 (mmol/dL),将计算出的数值除以该样品的蛋白含量,计算细胞中单位蛋白中钙的含量。

1.6 ALP 活性测定

每孔细胞用 PBS 洗 3 次,加入细胞 ALP 测定裂解液(含 0.2% NP-40,1 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)裂解 30 min 后,收集细胞,反复冻融 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 8000 r/min 离心 10 min 取上清,用 ALP 试剂盒(南京建成生物公司)进行检测,分别测定 $A_{\text{标准}}$ 和 $A_{\text{样品}}$,根据公式 $\text{ALP(U/g)} = A_{\text{样品}}/A_{\text{标准}} \times$ 标准管酚含量/样品中蛋白克数,计算出单位蛋白中 ALP 活性。

1.7 Western Blot 分析

在培养的 VSMC 用 80 μL (含终浓度为 1 mol/L 的 PMSF)裂解细胞,收集裂解细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 r/min 离心 10 min,Bradford 法检测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后结合相应的 SM α -actin(1:1000)、SM22 α (1:1000)、OPN(1:1000)、 β -actin(1:4000)、GAPDH(1:1000)、GRP78(1:4000)、anti-CHOP(1:500)、PERK(1:1000)、p-PERK(1:1000)、IRE1(1:1000)、P-IRE1(1:1000)和 ATF6(1:1000)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜,结合相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光试剂盒与硝酸纤维素膜共孵育后,放入暗盒内曝光,显影后再定影。用软件分析条带光

密度值,以 β -actin 或 GAPDH 条带的光密度值进行标化,所有实验重复三次。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 加重大鼠 VSMC 钙化

分别用不同浓度 Hcy (50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)处理钙化的 VSMC 14 天后,与钙化组相比,Hcy 显著增加大鼠钙化 VSMC 的钙含量和 ALP 活性,钙含量分别增加了 2.5 倍、4.17 倍、5.83 倍和 8.33 倍(均 $P < 0.05$),ALP 活性分别增加了 1.56 倍、2.18 倍、2.56 倍和 3.13 倍(均 $P < 0.05$)。表明 Hcy 可以促进大鼠钙化 VSMC 的钙化,并且其钙化程度随着 Hcy 浓度升高而加重(图 1)。由于 Hcy 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时即可加重 VSMC 的钙化,因此,后续的实验选用 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 处理细胞。

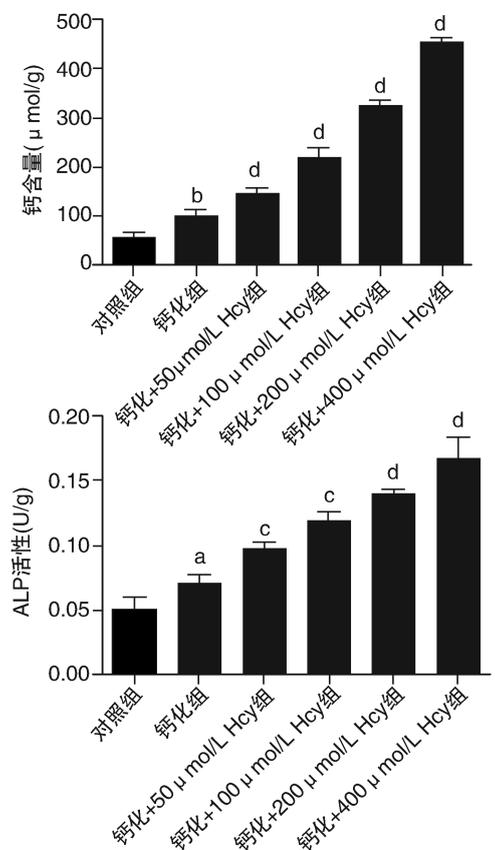


图 1. Hcy 加重 VSMC 的钙化 ($n = 6$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与钙化组比较。

Figure 1. Hcy increase VSMC calcification ($n = 6$)

2.2 Hcy 诱导 VSMC 内质网应激的激活

Hcy(100 $\mu\text{mol/L}$)处理显著激活 VSMC 内质网应激反应。Western Blot 结果显示,在给予钙化 VSMC 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 刺激后,钙化 VSMC 内质网应激相关因子蛋白表达显著增加。与钙化组相比,Hcy 处理组 p-PERK 水平升高了 37.8%、p-IRE1 升高了 27.5%、ATF6 升高了 26% (均 $P < 0.05$)。但 CHOP 和 GRP78 蛋白表达水平无明显改变(图 2 和表 1)。

2.3 ERS 抑制剂可阻断 Hcy 诱导的 VSMC 内质网应激的激活和钙化的加重

在给予钙化 VSMC Hcy (100 $\mu\text{mol/L}$) 刺激之前,用 ERS 抑制剂 PBA (5 mmol/L) 和 TAU (10 mmol/L) 进行预孵育可以显著减轻 Hcy 所引起的 ERS 相关因子的表达增加,与钙化 + Hcy 组相比,p-PERK 分别降低 64% 和 76%、p-IRE1 分别降低 65% 和 41.1%、ATF6 分别降低 50% 和 47% (均 $P < 0.01$)、CHOP 分别降低 47.4% 和 39.5% (均 $P <$

0.01)、PERK 分别降低 58.6% 和 69% (均 $P < 0.01$)、GRP78 分别降低 79.5% 和 72.7% (均 $P < 0.01$;图 2 和表 1)。ERS 抑制剂可显著抑制钙化 + Hcy 组 VSMC 钙化的加重,与钙化 + Hcy 组相比,给予 PBA 和 TAU 后,钙含量分别降低了 55.3% 和 53.9% (均 $P < 0.01$),ALP 活性分别降低了 56.8% 和 37.9% (均 $P < 0.01$;表 2)。茜素红染色结果表明,钙化 + Hcy 组出现大量深红色钙化结节,而给予 PBA 和 TAU 后可以明显减轻钙化结节的形成(图 3)。给予 PBA 和 TAU 后还可以减轻 Hcy 所引起的钙化 VSMC 收缩表型向成骨样细胞表型转变(图 4 和表 3),与钙化 + Hcy 组相比,钙化 + Hcy + PBA 组和钙化 + Hcy + TAU 组 SM α -actin 分别升高了 2.9 倍和 3.1 倍(均 $P < 0.01$)、SM22 α 分别升高了 1.8 倍和 2.3 倍(均 $P < 0.01$)、OPN 分别降低了 2.73 倍和 4.2 倍(均 $P < 0.01$),以上结果说明 Hcy 可能是通过激活 ERS 进而促进 VSMC 钙化的加重和其表型的转变。

表 1. 不同干预方法对 ERS 相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. Effects of different interventions on the expression of ERS relative proteins($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	p-PERK	p-IRE1	ATF6	CHOP	PERK	GRP78
对照组	0.75 \pm 0.43	1.35 \pm 0.05	0.53 \pm 0.44	1.43 \pm 0.46	0.52 \pm 0.36	2.31 \pm 0.10
钙化组	1.84 \pm 0.34 ^a	1.48 \pm 0.09 ^a	1.45 \pm 0.22 ^a	1.89 \pm 0.79 ^a	1.19 \pm 0.06 ^a	3.55 \pm 0.13 ^a
钙化 + Hcy 组	2.60 \pm 0.2 ^b	1.91 \pm 0.15 ^b	1.81 \pm 0.58 ^b	1.96 \pm 0.37	0.89 \pm 0.31	4.29 \pm 0.30
钙化 + Hcy + TAU 组	0.89 \pm 0.45 ^c	0.68 \pm 0.173 ^c	0.83 \pm 0.50 ^c	1.04 \pm 0.58 ^c	0.39 \pm 0.09 ^c	0.99 \pm 0.12 ^c
钙化 + Hcy + PBA 组	0.58 \pm 0.68 ^c	1.10 \pm 0.53 ^c	0.87 \pm 0.64 ^c	1.16 \pm 0.46 ^c	0.28 \pm 0.04 ^c	1.03 \pm 0.23 ^c

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

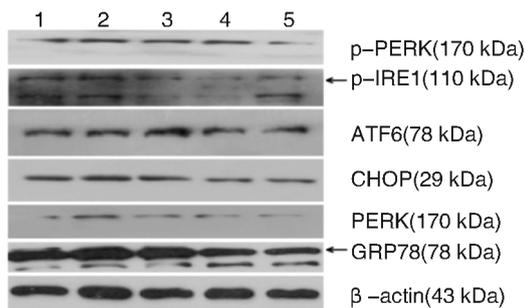


图 2. 不同干预方法对 ERS 相关蛋白的影响($n = 3$) 1 为对照组,2 为钙化组,3 为钙化 + Hcy 组,4 为钙化 + Hcy + TAU 组,5 为钙化 + Hcy + PBA 组。

Figure 2. Effects of different interventions on the expression of ERS relative proteins($n = 3$)

表 2. 给予 ERS 抑制剂减轻 Hcy 所诱导的 VSMC 钙化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. ERS inhibitors blocked VSMC calcification induced by Hcy($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	钙含量($\mu\text{mol/g}$)	ALP 活性(U/g)
对照组	59.33 \pm 3.06	0.06 \pm 0.01
钙化组	178.33 \pm 7.64 ^a	0.09 \pm 0.01 ^a
钙化 + Hcy 组	204.67 \pm 15.01 ^b	0.12 \pm 0.01 ^b
钙化 + Hcy + TAU 组	90.67 \pm 7.57 ^c	0.05 \pm 0.002 ^c
钙化 + Hcy + PBA 组	77.33 \pm 6.11 ^c	0.07 \pm 0.02 ^c

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

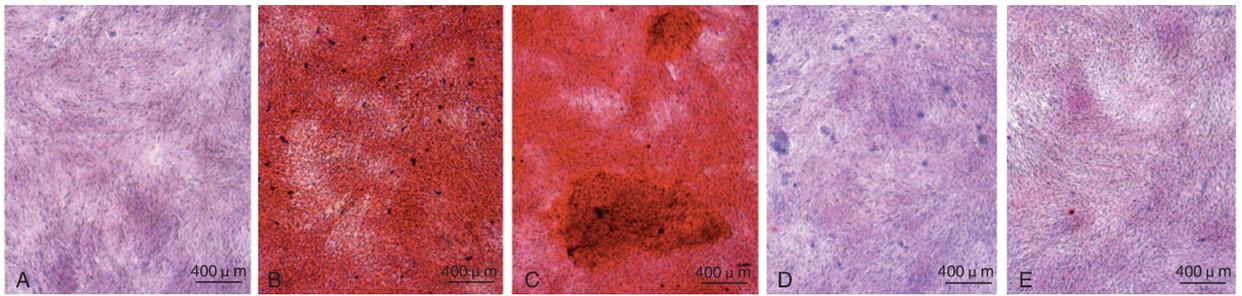


图 3. 茜素红染色显示 ERS 抑制剂减轻 Hcy 所诱导的 VSMC 钙化(×50) A 为对照组, B 为钙化组, C 为钙化 + Hcy 组, D 为钙化 + Hcy + TAU 组, E 为钙化 + Hcy + PBA 组。

Figure 3. ERS inhibitors blocked VSMC calcification induced by Hcy(×50)

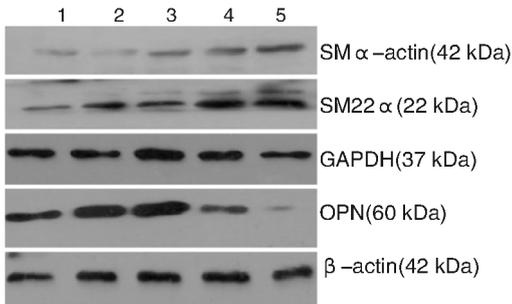


图 4. ERS 抑制剂抑制 VSMC 表型转变($n=3$) 1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为钙化 + Hcy 组, 4 为钙化 + Hcy + TAU 组, 5 为钙化 + Hcy + PBA 组。

Figure 4. ERS inhibitors blocked VSMC phenotype transition induced by Hcy($n=3$)

表 3. 给予 ERS 抑制剂抑制 VSMC 表型转变($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3. ERS inhibitors blocked VSMC phenotype transition induced by Hcy($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	SM α -actin	SM22 α	OPN
对照组	0.48 ± 0.17	0.73 ± 0.08	0.74 ± 0.20
钙化组	0.27 ± 0.06 ^a	0.66 ± 0.18 ^a	1.19 ± 0.11 ^a
钙化 + Hcy 组	0.24 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.18 ^b	1.70 ± 0.28 ^b
钙化 + Hcy + TAU 组	0.74 ± 0.02 ^d	0.88 ± 0.07 ^c	0.61 ± 0.16 ^d
钙化 + Hcy + PBA 组	0.77 ± 0.14 ^d	1.14 ± 0.07 ^c	0.41 ± 0.14 ^d

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

3 讨 论

血管钙化是一种复杂的病理过程,与多种疾病密切相关,具体发病机制尚不明确。新近研究发现多种病理过程均可促进血管钙化,如氧化应激、炎症、钙磷代谢紊乱、细胞凋亡和成骨样细胞表达的增加,并且在临床研究中发现冠状动脉钙化是心血管疾病发病率和死亡率的独立预测指标,而且腹主动脉钙化对继发性心血管疾病也是一项重要的预

测指标^[16]。探索血管钙化发病的新机制对于防治血管钙化具有重要意义。本研究发现 Hcy 显著促进血管钙化,并激活 ERS 反应。应用 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸和牛磺酸可阻断 Hcy 诱导的 VSMC 钙化和 ERS 激活。

Hcy 作为一种来自于蛋氨酸的含硫氨基酸,可以在机体中发挥多种作用,如激活单核巨噬细胞中的炎症信号通路^[5],促进内皮细胞功能的失调,诱导氧化应激,并导致动脉硬化的发生^[17]。Zou 等^[18]发现在 VSMC 中, Hcy 可通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和促进 p47phox 的磷酸化诱导 NADPH 氧化酶的激活,从而诱导 VSMC 中活性氧的增加。近年来,多项临床研究证实 Hcy 与血管钙化密切相关。Sun 等研究者^[19]对 659 例未出现临床心血管疾病症状的患者进行临床检测,并根据其血液中 Hcy 水平将其进行分类,发现 Hcy 与冠状动脉粥样硬化斑块中的钙化密切相关。在另一项临床研究中, Kim 等研究者^[8]随机对 21235 例韩国男性进行冠状动脉钙化积分指标的检测,并根据血液中 Hcy 水平进行分类,结果同样表明, Hcy 水平与冠状动脉钙化水平具有独立的相关关系。本研究在离体培养的 VSMC 钙化模型上发现 Hcy 显著促进大鼠 VSMC 钙结节形成,钙含量和 ALP 活性显著增加,与文献结果一致^[10]。

Li 和 Van 等研究者^[9-10]分别发现, Hcy 不仅可以通过 MAPK 通路促进 VSMC 中钙化的形成,还可通过促进血管中成骨样分化细胞参与血管钙化的发生发展。我们实验室的前期研究发现, ERS 及其诱导的凋亡反应在血管钙化的发生发展过程中具有重要作用,且大量文献表明, Hcy 也可在多种细胞中促进 ERS 反应的发生,如 Hcy 可以通过激活 ERS 反应导致内皮细胞凋亡^[11],还可通过激活 ERS 促进脂肪组织中胰岛素抵抗的发生^[20]。本研究中我

们发现 Hcy 显著促进钙化 VSMC 内质网应激的激活, p-PERK、p-IRE1、GRP78 等 ERS 相关分子表达显著增高。进一步的研究发现 ERS 的非选择性抑制剂 PBA 和 TAU 可明显阻断 Hcy 诱导的 VSMC 中 ERS 标志分子的表达水平, 逆转了 Hcy 诱导的 VSMC 钙化结节形成、钙含量和 ALP 活性增加, 抑制 VSMC 向成骨样细胞表型转化。所有结果提示 Hcy 可能通过激活 VSMC 内的 ERS 加重 VSMC 钙化。

综上所述, 我们的研究在离体培养的大鼠 VSMC 钙化模型上发现 Hcy 可以促进 VSMC 钙化, 激活 ERS 反应, ERS 抑制剂可阻断 Hcy 的上述作用。我们的研究首次发现 Hcy 可以通过激活 ERS 反应促进血管钙化, 揭示了 Hcy 促进血管钙化的新机制, 为血管钙化的治疗提供了新的靶点。

[参考文献]

- [1] Ketteler M, Rothe H, Kruger T, et al. Mechanisms and treatment of extraosseous calcification in chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(9): 509-516.
- [2] Pavitt GD, Ron D. New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(6).
- [3] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-086.
- [4] Millott R, Dudek E, Michalak M. The endoplasmic reticulum in cardiovascular health and disease[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(9): 1 209-217.
- [5] Duan X, Zhou Y, Teng X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(4): 694-699.
- [6] Duan XH, Chang JR, Zhang J, et al. Activating transcription factor 4 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to vascular calcification[J]. *Apoptosis*, 2013, 18(9): 1 132-144.
- [7] 马琦, 边云飞, 白瑞, 等. 吡格列酮通过内质网应激致凋亡途径对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 351-356.
- [8] Kim BJ, Kim BS, Kang JH. Plasma homocysteine and coronary artery calcification in Korean men[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2015, 22(4): 478-485.
- [9] Li J, Chai S, Tang C, et al. Homocysteine potentiates calcification of cultured rat aortic smooth muscle cells[J].

Life Sci, 2003, 74(4): 451-461.

- [10] Van Campenhout A, Moran CS, Parr A, et al. Role of homocysteine in aortic calcification and osteogenic cell differentiation[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2): 557-566.
- [11] Fang K, Chen Z, Liu M, et al. Apoptosis and calcification of vascular endothelial cell under hyperhomocysteinemia[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 403.
- [12] 朱琳, 王彦军, 俞天虹, 等. 红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(1): 5-10.
- [13] Wei H, Zhang R, Jin H, et al. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(9): 1 079-091.
- [14] Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, et al. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine; amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine[J]. *Circulation*, 2001, 104(10): 1 165-170.
- [15] Cai Y, Xu MJ, Teng X, et al. Intermedin inhibits vascular calcification by increasing the level of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4): 864-873.
- [16] Arad Y, Goodman KJ, Roth M, et al. Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: the St. Francis Heart Study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(1): 158-165.
- [17] Meng S, Ciment S, Jan M, et al. Homocysteine induces inflammatory transcriptional signaling in monocytes[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013, 18: 685-695.
- [18] Zou T, Yang W, Hou Z, et al. Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells; role of p38 MAPK and p47phox[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(12): 908-915.
- [19] Sun Q, Jia X, Gao J, et al. Association of serum homocysteine levels with the severity and calcification of coronary atherosclerotic plaques detected by coronary CT angiography[J]. *Int Angiol*, 2014, 33(4): 316-323.
- [20] Li Y, Zhang H, Jiang C, et al. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 9 583-592.

(此文编辑 许雪梅)