

血管平滑肌细胞自噬与血管钙化关系的研究进展

蒲江 综述, 欧三桃 审校

(西南医科大学附属医院肾病内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 自噬; 血管钙化

[摘要] 细胞自噬是细胞利用溶酶体进行自身降解的生物学过程, 是一种进化上高度保守的分解代谢过程, 对于维持细胞稳态起着重要作用。血管钙化是广泛存在于动脉粥样硬化、糖尿病、终末期肾病等多种疾病中的共同病理表现, 是影响心血管疾病死亡率的独立危险因素, 目前尚缺乏有效的治疗手段。近年来发现血管平滑肌细胞(VSMCs)自噬可通过调节其降解活动及平滑肌细胞的成骨样分化, 从而在调控血管钙化中发挥重要作用。本文就VSMCs自噬与血管钙化的最新研究进展做一综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The recent advances between vascular smooth muscle cells autophagy and vascular calcification

PU Jiang, OU San-Tao

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Vascular smooth muscle cells; Autophagy; Vascular calcification

[ABSTRACT] Autophagy is a highly conserved catabolism process of self-degradation responsible for maintaining cellular homeostasis. Vascular calcification is common in many diseases such as atherosclerosis, diabetes and end-stage renal disease, which is a major risk factor of cardiovascular mortality. Today the effective therapy for vascular calcification is still unavailable. Recent studies indicate that vascular smooth muscle cells (VSMCs) autophagy may play an important role in vascular calcification by regulating the activity of self-degradation and the transdifferentiation process of VSMCs to osteogenic phenotype. This article briefly reviews the recent advances between VSMCs autophagy and vascular calcification.

1 自噬的概述

上世纪 50 年代 Christian de Duve 通过电镜观察到自噬体结构, 并在 1963 年首次提出“自噬”的概念, 以便区分溶酶体降解细胞外物质与细胞本身成分。目前认为自噬是细胞利用溶酶体将蛋白质、细胞器等成分进行降解的过程, 是一种进化上高度保守的分解代谢过程, 对于维持细胞稳态起着重要作用。

自噬有 3 种形式: 微自噬 (microautophagy)、巨自噬 (macroautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。微自噬是指溶酶体膜自身内陷包裹底物进行降解的过程。

分子伴侣介导的自噬是指热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 识别并结合含有特定氨基酸序列的底物, 形成的复合物再与溶酶体膜上的 LAMP-2A 受体结合并转入溶酶体内进行降解的过程。巨自噬是指细胞内的双层生物膜结构包裹部分胞质及底物形成自噬小体, 自噬小体再与溶酶体融合形成自噬溶酶体进而进行降解的过程, 其中伴随着自噬小体特异性标志物 LC3 II 的表达。自噬小体的形成受到严格的基因调控, 其具体的形成过程尚不明确, 目前的研究多集中于巨自噬, 故本文亦阐述巨自噬, 简称自噬。

研究发现营养缺乏、缺氧、氧化应激、病原菌感染、射线、化疗、细胞器损伤、蛋白质聚集等因素均

[收稿日期] 2016-04-07

[修回日期] 2016-07-31

[作者简介] 蒲江, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化, E-mail 为 277958902@qq.com。通讯作者欧三桃, 博士, 教授, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化, E-mail 为 ousantao@163.com。

可诱导细胞自噬,其中以营养缺乏最常见^[1-2]。当细胞饥饿时,细胞自噬可以将底物降解成基本活性成分供细胞再利用。总体来说,在大多数应激条件下细胞自噬可通过降解功能失调的细胞成分而保持细胞稳态和存活;然而,过度的细胞自噬亦可能通过激活细胞凋亡途径或损伤重要细胞器而促进细胞死亡。

在疾病发生发展的过程中,自噬涉及到发育、分化、免疫、衰老、死亡等诸多方面。研究发现自噬相关基因的突变和自噬通量的变化可以促进神经退行性疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病等)的发生^[3],幽门螺杆菌感染诱导的细胞自噬也可通过影响细胞外基质降解、肿瘤血管生成、肿瘤微环境、上皮-间质转化等多方面影响胃癌的发生发展^[4],适当的自噬活动对于维持心血管系统的稳态及功能也起着极其重要的作用^[5]。近年来有学者发现自噬在调控血管钙化中可能发挥着重要的作用,认为自噬可能作为一种细胞保护机制促进胶原的降解,而胶原是细胞成骨样分化的一种标志蛋白。总之,细胞自噬与肿瘤、神经退行性疾病、肌肉疾病、代谢综合征、感染、免疫性疾病、心血管疾病等密切相关,在不同的疾病中细胞自噬分别发挥着独特的作用。

2 血管钙化的概述

血管钙化是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)、高血压、动脉粥样硬化、糖尿病血管病变等的共同病理表现,是影响心血管疾病死亡率的独立危险因素,有报道血管钙化导致的死亡率约占终末期肾脏病总病死率的30%左右^[6]。血管钙化按病理解剖学分为:(1)静脉钙化;(2)动脉钙化,包括内膜钙化、中膜钙化、主动脉瓣钙化及钙化防御。内膜钙化类似于软骨内骨化,呈点灶状或斑片状骨化,与动脉粥样硬化、炎症等相关;中膜钙化类似于膜内骨形成过程,呈弥漫性同心圆状分布,与慢性肾脏病、糖尿病、高龄等相关^[7]。既往认为血管钙化是钙盐被动沉积于血管壁的过程,近年研究认为血管钙化是类似于骨发生的、高度可调控的生物学过程,其关键环节是在高磷、慢性炎症、氧化应激等各种刺激因素下血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)向成骨样细胞表型转换,进而合成钙化相关蛋白、促进基质形成和钙盐沉积的主动过程。近年来大量研究显示VSMCs坏死或凋亡后的降解产物基质小泡是血管钙化的启

动环节^[8]。在CKD状态下,各种致钙化因素损伤VSMCs,从而释放出含有很高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性的基质小泡,形成易于钙磷沉积的微环境,同时基质小泡结合细胞外基质蛋白从而启动血管钙化过程。目前研究发现MicroRNAs(miRs)在调控血管钙化过程中也发挥着关键作用,它不但可以调节VSMCs的基因重排,而且可以对血管钙化过程中的相关细胞做出功能性应答^[9]。研究发现miRs能够下调VSMCs的收缩表型并诱导其成骨样分化,钙化的VSMCs能产生含有miRs的基质小泡,这些miRs则可调节其它相关细胞的表型,同时miRs还可调节破骨细胞的生成与功能而调控血管钙化。近年来研究提示自噬与血管重塑关系密切,血管壁各层细胞的改变均与自噬相关。研究发现自噬可以对抗高血糖诱导血管内皮细胞的衰老和凋亡及减轻晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)诱导的成骨细胞凋亡^[10-11],李小红等^[12]认为低剪切应力可抑制血管内皮细胞自噬进而抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达、上调内皮素1(ET-1)的表达,而增强自噬能改善该过程,Pushpakumar等^[13]研究发现基质金属蛋白酶抑制剂可以诱导自噬并降解细胞外基质如I型胶原蛋白而改善高血压所致的肾血管重塑,而AGEs及细胞外基质均与血管钙化关系密切。总之,矿物失衡、钙化抑制剂缺乏、炎症、VSMCs表型转换等多种因素均参与了血管钙化的发生发展过程。

3 平滑肌细胞自噬与血管钙化的关系

3.1 自噬参与在高磷诱导的血管钙化

慢性肾脏病患者普遍存在高磷血症,同时高磷血症也是CKD患者血管钙化发生和进展的主要因素,其机制包括诱导VSMCs凋亡及成骨样分化、促进基质小泡的释放及基质重塑^[14]。Zhao等^[15]研究发现高磷可以通过增加线粒体膜电位而诱导ROS产生,增加的ROS可以激活NF- κ B信号通路诱导VSMCs成骨样分化,促进血管钙化。此外ROS也可诱导VSMCs自噬,使用ROS抑制剂可明显抑制细胞自噬。当予以丙戊酸诱导自噬后,VSMCs钙化明显减轻;当用3-甲基腺嘌呤(3-MA)或敲除Atg5基因(参与细胞自噬的重要基因)抑制自噬时,高磷诱导的VSMCs凋亡明显减少,但VSMCs钙化却明显加重;在抑制自噬的同时予以凋亡抑制剂Z-VAD-FMK处理后,仍观察到相同的结果。通过进一步研

究发现抑制自噬促进 VSMCs 钙化的作用是通过增加基质小泡的释放实现的,与高磷诱导的 VSMCs 凋亡及成骨样分化无关。因此该研究认为 VSMCs 自噬是作为一种内源性的保护性机制以对抗高磷诱导的血管钙化。他们的另一项研究^[16]还发现高磷可通过激活雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路诱导 VSMCs 成骨样分化并促进血管钙化,当予以雷帕霉素抑制 mTOR 通路后,可降低成骨样分化标志物 Msx2 和 Cbfa-1 的表达并增加收缩蛋白 SM- α -actin 和 SM22 α 的表达,减轻血管钙化,当用亮氨酸激活 mTOR 通路后,结果则刚好相反;研究还发现当用 3-MA 抑制雷帕霉素诱导的自噬后,雷帕霉素依然能减轻血管钙化,提示雷帕霉素抑制血管钙化的作用并不依赖于其诱导自噬的作用;进一步研究发现雷帕霉素的上述作用是通过上调 Klotho 基因实现的。因此在该研究中雷帕霉素虽然可减轻血管钙化同时诱导自噬,但二者之间并无明显关系。

3.2 自噬参与 TGF- β 1 诱导的血管钙化

研究表明转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 在调节血管钙化方面发挥着重要作用, Huang 等^[17]研究发现内源性 SO₂ 可以通过下调 TGF- β /Smad 信号通路而减轻血管钙化, Wang 等^[18]认为 TGF- β 可招募间质干细胞聚集于血管病变处并诱导其成骨样分化促进血管钙化。Cui 等^[19]研究发现 TGF- β 1 可通过激活 β -catenin 通路呈时间依赖性增加 VSMCs 成骨样分化标志物碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白 2、骨钙素的表达,使 VSMCs 钙盐沉积明显加重,而阿托伐他汀则抑制 TGF- β 1 诱导的血管钙化,同时诱导 VSMCs 自噬,当予以 3-MA 抑制自噬后,阿托伐他汀抑制 VSMCs 成骨样分化及钙化的保护作用被明显削弱。他们进一步研究发现当应用重组 Wnt3A 蛋白增加 β -catenin 水平后,阿托伐他汀诱导的 VSMCs 自噬及其保护作用被明显抑制,相反, β -catenin 通路抑制剂 JW74 则可增强阿托伐他汀的上述作用。因此该研究认为阿托伐他汀通过下调 β -catenin 蛋白诱导 VSMCs 自噬以拮抗 TGF- β 1 诱导的血管钙化。

3.3 自噬参与氧化型低密度脂蛋白诱导的血管钙化

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)是动脉粥样硬化发生和发展的关键因素,有报道 ox-LDL 能促进体外 VSMCs 成骨样分化及钙化。Zhou 等^[20]研究表明,ox-LDL 可以通过激活中性鞘磷脂酶-神经酰胺信号通路和促进 P38 MAPK 的磷酸化诱导 VSMCs

凋亡而启动血管钙化。Farrokhi 等^[21]发现 ox-LDL 可增加 Runx2 和骨结合素的基因表达。Bear 等^[22]发现 ox-LDL 可加强 β -磷酸甘油诱导的 VSMCs 成骨样分化而促进血管钙化。近年来研究发现自噬在动脉粥样硬化中起着保护性作用, Ouimet 等^[23]认为在巨噬细胞源性泡沫细胞中自噬可以将脂滴转运至溶酶体而被溶酶体酸性酯酶降解成游离胆固醇,游离胆固醇在 ABCA1 蛋白(ATP-binding cassette protein type A1)的介导下转运至胞外而减轻粥样斑块的形成,大量研究也表明抑制雷帕霉素靶蛋白信号通路诱导的自噬发挥着抗动脉粥样硬化和稳定斑块的作用^[24],然而也有研究表明在动脉粥样硬化中自噬起着加速斑块破裂等不利影响,推测这种负面效应可能与自噬被过度激活有关^[25]。陆立鹤等^[26]则发现 ox-LDL 呈时间依赖性促进 VSMCs 钙化,同时上调 Beclin-1 基因和 VSMCs 成骨样分化的关键分子 cbfa1 的表达。当予以 3-MA 抑制自噬后,能明显减轻 Beclin-1 和 cbfa1 的上调,并减轻 ox-LDL 诱导的 VSMCs 钙化。因此他们认为 ox-LDL 通过上调 Beclin-1 诱导 VSMCs 自噬最终促进血管钙化。因此,自噬是减轻还是促进血管钙化尚有争议。

4 自噬在平滑肌细胞表型转换中的作用

VSMCs 的表型转换是血管钙化发生的关键环节,因此探究自噬在 VSMCs 表型转换中的作用有着重要意义。研究发现 VSMCs 成骨样分化的信号通路主要包括 TGF- β 信号通路、BMP 信号通路、Wnt 信号通路、Notch 信号通路等,各通路之间形成一个相互作用的网络系统。Pantovic 等^[27]发现自噬可促进骨髓间充质干细胞成骨样分化。Kim 等^[28]研究表明在小鼠系膜细胞中断裂 Beclin-1 基因或用 siRNA 抑制该蛋白表达均可增加 I 型胶原蛋白的水平。Zheng 等^[29]研究认为骨桥蛋白能同时诱导 VSMCs 自噬并转化为合成型。Salabei 等^[30]研究发现血小板源性生长因子(PDGF)可通过诱导 VSMCs 自噬而降低收缩表型标志物钙调蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的表达,上调合成表型标志物骨桥蛋白和波形蛋白的表达;当抑制自噬时,可明显削弱 PDGF 降低钙调蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的作用,减少细胞外基质的产生,抑制平滑肌细胞的增殖和迁移。

血管钙化是 CKD 患者心血管疾病病死率的独立危险因素,虽然关于血管钙化的机制尚未完全阐明,但随着研究的深入,多种因素如凋亡、自噬、MicroRNAs、基质小泡、VSMCs 表型转换等均与血管钙

化的发生和进展密切相关,其中 VSMCs 的表型转换是血管钙化的关键。临床上对于血管钙化的治疗手段极为有限,重点在于防控,因此全面了解血管钙化的发生机制,寻找新的治疗靶点,对于改善患者预后有重要意义。

[参考文献]

- [1] Li G, Tang D, Lotze MT. Menage a trois in stress: damp, redox and autophagy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(5): 380-390.
- [2] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [3] Kiriya Y, Nochi H. The function of autophagy in neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26 797-26 812.
- [4] Qian H R, Yang Y. Functional role of autophagy in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17 641-17 651.
- [5] Lavandro S, Chiong M, Rothermel BA, et al. Autophagy in cardiovascular biology[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 55-64.
- [6] Cozzolino M, Mazzaferro S, Pugliese F, et al. Vascular calcification and uremia: what do we know[J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(2): 339-346.
- [7] 王中群, 刘乃丰. 血管钙化的病理分型及临床新进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2011, 30(2): 176-178.
- [8] Shanahan CM. Autophagy and matrix vesicles: new partners in vascular calcification[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 984-986.
- [9] Leopold JA. Micromas regulate vascular medial calcification[J]. *Cells*, 2014, 3(4): 963-980.
- [10] Chen F, Chen B, Xiao FQ, et al. Autophagy protects against senescence and apoptosis Via the ras-mitochondria in high-glucose-induced endothelial cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(4): 1 058-1 074.
- [11] Yang L, Meng H, Yang M. Autophagy protects osteoblasts from ages induced apoptosis through intracellular ros[J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(4): 291-300.
- [12] 李小红, 郭凤霞, 杨沁, 等. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 875-880.
- [13] Pushpakumar SB, Kundu S, Metreveli N, et al. Matrix metalloproteinase inhibition mitigates renovascular remodeling in salt-sensitive hypertension[J]. *Physiol Rep*, 2013, 1(3): e00063.
- [14] Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, et al. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate[J]. *Circ Res*, 2011, 109(6): 697-711.
- [15] Zhao MM, Cai Y, Guan QC, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 1042-1051.
- [16] Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, et al. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via klotho up-regulation[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 711-721.
- [17] Li Z, Huang Y, Du J, et al. Endogenous sulfur dioxide inhibits vascular calcification in association with the tgfbeta/smad signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 266.
- [18] Wang W, Li C, Pang L, et al. Mesenchymal stem cells recruited by active tgfbeta contribute to osteogenic vascular calcification[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(12): 1 392-1 404.
- [19] Liu D, Cui W, Liu B, et al. Atorvastatin protects vascular smooth muscle cells from tgfbeta1-stimulated calcification by inducing autophagy via suppression of the beta-catenin pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(1): 129-141.
- [20] Liao L, Zhou Q, Song Y, et al. Ceramide mediates ox-ldl-induced human vascular smooth muscle cell calcification via p38 mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82379.
- [21] Farrokhi E, Samani KG, Chaleshtori MH, et al. Effect of oxidized low density lipoprotein on the expression of runx2 and sparc genes in vascular smooth muscle cells[J]. *Iran Biomed J*, 2015, 19(3): 160-164.
- [22] Bear M, Butcher S, Shaughnessy G, et al. 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.
- [23] Ouimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 655-667.
- [24] Martinet W, De Loof H, De Meyer GR. Mtor inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233(2): 601-607.
- [25] 于红红, 吴玛莉, 冷冷, 等. 自噬与动脉粥样硬化的关系及中药的干预作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(7): 736-740.
- [26] 陆立鹤, 颜建云, 于汇民, 等. 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[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2010, 31(6): 772-775.
- [27] Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, et al. Coordinated time-dependent modulation of Ampk/Akt/Mtor signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 524-531.
- [28] Kim SI, Na HJ, Ding Y, et al. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (Tgf)-beta1[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 11 677-11 688.
- [29] Zheng YH, Tian C, Meng Y, et al. Osteopontin stimulates autophagy via integrin/Cd44 and P38 Mapk signaling pathways in vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(1): 127-135.
- [30] Salabei JK, Cummins TD, Singh M, et al. Pdgf-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress[J]. *Biochem J*, 2013, 451(3): 375-388.

(此文编辑 朱雯霞)