

1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号调控内皮细胞自噬抑制动脉粥样硬化钙化

杨萍, 崔星钢, 李波, 许尧, 王中群, 仲威, 邵晨, 严金川

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 1,25 二羟基维生素 D₃; 人脐静脉内皮细胞; 自噬; 钙调蛋白; 动脉粥样硬化钙化

[摘要] 目的 探讨 1,25 二羟基维生素 D₃(1,25-(OH)₂D₃) 是否通过信号调控人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 自噬抑制细胞钙化及小鼠动脉粥样硬化斑块内钙化。方法 (1) 将体外培养的 HUVEC 高脂刺激自噬后予 1,25-(OH)₂D₃ 干预后, 通过荧光显微镜、透射电镜、蛋白免疫印记(Western blot) 检测细胞自噬水平; 利用慢病毒过表达或者沉默钙调蛋白(CaM), 运用 Western blot、茜素红染色法、钙检测试剂盒检测细胞钙化指标骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、碱性磷酸酶(ALP)。(2) 取 6~8 周龄 ApoE^{-/-} 雄性小鼠高脂饲养形成动脉粥样硬化模型, 1,25-(OH)₂D₃ 灌胃后尾静脉注射 CaM 过表达或者沉默慢病毒, Western blot 检测组织自噬及钙化水平指标; 扫描电镜观察主动脉斑块自噬小体及钙沉积; HE 及 Von Kossa 染色法分别检测小鼠主动脉粥样硬化及钙化程度。结果 体外实验显示, 1,25-(OH)₂D₃ 处理后细胞自噬增强, Ca²⁺ 与 CaM 上调; 与对照组相比, CaM 过表达组自噬增强, 细胞钙化减轻, ApoE^{-/-} 小鼠斑块内钙化明显被抑制; CaM 沉默组细胞自噬流不通畅, 细胞钙沉积增加; ApoE^{-/-} 小鼠斑块内钙化明显增加(P<0.01)。结论 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号调控 HUVEC 自噬抑制细胞钙化及小鼠动脉粥样硬化斑块钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

1,25-(OH)₂D₃ regulates HUVEC autophagy and inhibits atherosclerotic calcification through Ca²⁺/CaM signaling

YANG Ping, CUI Xinggang, LI Bo, XU Yao, WANG Zhongqun, ZHONG Wei, Shao Chen, YAN Jinchuan

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] 1,25-(OH)₂D₃; human umbilical vein endothelial cells; autophagy; calmodulin; atherosclerotic calcification

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether 1,25-(OH)₂D₃ can regulate the autophagy and calcification of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the calcification of mouse atherosclerotic plaque through Ca²⁺/CaM signal.

Methods (1) HUVEC were incubated in high fat microenvironment to stimulate autophagy. The autophagy level was detected by Western blot, fluorescence microscopy, transmission electron microscopy after HUVEC being stimulated by 1,25-(OH)₂D₃. Lentiviruses were used to overexpress or silence calmodulin (CaM), and the calcification was tested by Western blot, calcium ion detection kit, Alizarin red. (2) ApoE^{-/-} mice fed with high fat diet were randomly divided into 3 groups: control group (1,25-(OH)₂D₃ 2.5 μg/(kg·d) dissolved in 0.1 mL soybean oil, Gavage); CaM overexpressed group (control +CaM overexpressed lentivirus, Caudal vein injection) and CaM silenced group (control +CaM silenced lentivirus, Caudal vein injection). Scanning electron microscope was used to observe autophagosomes and calcification of the aorta. HE and Von Kossa staining were used to detect the As degree and calcification of the aorta, respectively.

Results The autophagy was prompted and the expression of Ca²⁺ and CaM were up-regulated after HUVEC being stimulated

[收稿日期] 2018-08-20

[修回日期] 2018-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金(81670405); 江苏省自然科学基金(BK20161355); 镇江市社会发展项目(2017030); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX17_1818)

[作者简介] 杨萍, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 Yangpingziji@163.com。通信作者严金川, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。

by 1,25-(OH)₂D₃. Compared with the control group, CaM overexpressed group showed enhanced autophagy and reduced calcification in HUVEC and As plaque in ApoE^{-/-} mice. While the CaM silencing group showed autophagy dysfunction, increased calcium depositions in HUVEC and plaques. **Conclusion** 1,25-(OH)₂D₃ regulates HUVEC autophagy to inhibit cell calcification and plaque calcification through Ca²⁺/CaM signaling.

动脉粥样硬化(atherosis, As)是一种慢性炎症性疾病,斑块内钙化是其终末病理表现,可引发严重的心脑血管及外周血管疾病等不良事件。血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)损伤是As发生发展的始动环节^[1-2],炎症、氧化应激、饥饿等多种因素干预诱发内皮细胞的异常自噬在内皮细胞功能异常中发挥了关键作用^[3-4]。自噬是细胞利用溶酶体降解细胞内受损的细胞器、变性蛋白及衰老结构等,清除和回收利用大分子物质,从而进行损伤修复、细胞更新及促进细胞生存的生物过程^[5]。最新研究表明^[6-8],自噬在As的形成以及斑块钙化中发挥了重要作用,促进内皮细胞自噬水平可以稳定细胞功能、促进细胞存活;抑制自噬后,内皮细胞功能障碍,向成骨-成软骨表型方向分化,促进钙化^[9]。表明自噬水平的改变影响内皮细胞功能。目前将自噬作为疾病治疗靶点的研究越来越多^[10-11],1,25-(OH)₂D₃有增强自噬的药理学作用,近来,有研究利用1,25-(OH)₂D₃治疗炎症性肠病^[12]及多发性硬化^[13];我们前期用1,25-(OH)₂D₃干预HUVEC后,细胞Ca²⁺水平升高并激活钙调蛋白(calmodulin, CaM)进而减轻细胞钙化。1,25-(OH)₂D₃增强自噬这一特点可能在预防、治疗As等自噬相关的疾病中具有一定的前景。本研究旨在明确1,25-(OH)₂D₃是否通过影响血管内皮细胞自噬进而影响钙化以及如何调控自噬影响钙化,从而为As的防治提供新的治疗策略及靶点。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

6~8周龄ApoE^{-/-}雄性小鼠购于南京大学动物中心。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购于中科院上海细胞库。1,25-(OH)₂D₃购于美国Sigma公司。U6-VshRNA-CMV-PuroR空白载体对照、CaM过表达及沉默表达慢病毒(1×10¹²PFU/L)由上海生工合成,CD31、LC3 II/I、p62一抗购于美国Abcam公司;骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体购于美国Immunoway公司;Ad-mRFP-GFP-LC3(1×10¹³

PFU/L)购于汉恒生物科技有限公司;钙离子检测试剂盒购于南京建成公司;苏木素、伊红染色液购买于碧云天生物技术研究;茜素红染色液试剂盒购于康为世纪公司;Von Kossa染色液购自上海舜百生物有限公司。

1.2 体外细胞培养及分组

将HUVEC用含10%FBS的DMEM培养基37℃、5%CO₂环境下培养进行如下实验。(1)1,25-(OH)₂D₃对细胞自噬的影响,实验分为:空白组、对照组(ox-LDL 40 mg/L)和1,25-(OH)₂D₃干预组(ox-LDL 40 mg/L+1,25-(OH)₂D₃ 50 μg/L);培养24 h后分别利用荧光显微镜观察自噬小体与溶酶体融合情况,透射电镜检测自噬小体数量及钙沉积情况,Western blot法检测LC3 II/I、p62及CaM蛋白表达水平。(2)继之在1,25-(OH)₂D₃干预细胞的基础上过表达或沉默表达CaM,观察Ca²⁺/CaM对于细胞钙化的影响,实验分为:①对照组(ox-LDL 40 mg/L+1,25-(OH)₂D₃ 50 μg/L);②空载体组(对照组基础上加空白病毒载体4 μL/孔);③CaM过表达组(对照组基础上加CaM过表达慢病毒4 μL/孔);④CaM沉默组(对照组基础上CaM沉默表达慢病毒4 μL/孔);病毒干预4 h后更换普通培养基继续培养至24 h,通过钙离子检测试剂盒检测细胞Ca²⁺含量,茜素红染色检测细胞钙化,Western blot检测CaM水平变化以及钙化相关蛋白BMP-2和ALP表达。

1.3 体内实验分组及方法

取6~8周龄ApoE^{-/-}小鼠18只,体重约20 g,SPF级动物实验中心予以高脂饲养(0.3%胆固醇,15%可可脂)至第12周,随机分为三组,每组6只:①对照组(高脂饲养+1,25-(OH)₂D₃ 2.5 μg/(kg·d)溶于0.1 mL大豆油,隔日一次灌胃,连续4周);②CaM过表达组(对照组基础上加CaM过表达慢病毒100 μL尾静脉注射);③CaM沉默组(对照组基础上加CaM沉默表达慢病毒100 μL尾静脉注射)。1,25-(OH)₂D₃灌胃后1周,CaM过表达及沉默表达病毒于17周、19周尾静脉注射各2次,第20周脱臼法处死小鼠并在胸主动脉节段取材,Western blot检测组织自噬及钙化水平,电镜检测斑块内自噬小体及钙化,HE染色评价As程度,Von Kossa染

色法检测斑块钙化情况。

1.4 免疫荧光检测自噬及自噬流

将空白组、对照组及 1, 25-(OH)₂D₃ 干预组 HUVEC 分别感染自噬双标腺病毒 (mRFP-GFP-LC3) 后观察自噬流。将 1×10⁴ 的细胞种于 12 孔板中培养 24 h, 按 200:1 比例用无血清培养基稀释浓缩腺病毒, 12 孔板每孔加入 400 μL 腺病毒稀释液, 4 h 后 PBS 洗 2 遍更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 24 h, 固定、染核、拍照分析。

1.5 透射电镜观察 HUVEC 及 As 斑块中自噬小体形成

收集连续干预 14 天的内皮细胞, 500 g 离心 5 min 后, 弃上清, 加入 4℃ 预冷 3% 戊二醛溶液预固定 5 min, 吹打细胞, 置于冰上。500 g 离心 5 min 后, 弃上清, 加入 4℃ 预冷 3% 戊二醛溶液及少许 10% BSA, 冰上放置 4 h, PBS 清洗细胞后, 用 1% 锇酸冰上固定 2 h; 不同浓度梯度酒精及丙酮脱水, 环氧树脂、包埋, 烘箱内烘烤固化, 超薄切片机切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后进行电镜观察。ApoE^{-/-}小鼠胸主动脉粥样硬化斑块分别缓慢加入 3% 戊二醛, 置于 4℃ 冰箱内固定 4 h 以上, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 4℃ 冰箱过夜。余步骤同细胞电镜。

1.6 钙含量测定

向培养细胞的 6 孔板每孔加入 1 mL 0.6 mmol/L HCl, 按钙含量检测试剂盒说明配置反应液, 在酶标仪上读取波长为 610 nm 处的吸光度值。按公式计算钙含量。将 6 孔板中剩余的细胞提取细胞总蛋白, BCA 法测定细胞蛋白含量。用每孔中蛋白含量标准化钙含量 (钙离子含量/蛋白含量单位: mol/g 蛋白)。实验重复 3 次, 并进行统计学分析。

1.7 细胞茜素红染色

按照前文所述处理细胞后继续培养 1 周, 各组细胞 PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 双蒸水漂洗 3 次; 按照试剂盒步骤说明行茜素红染色; 染色后封片, 置于倒置显微镜下观察、拍照。

1.8 Western blot 法检测 CaM、自噬相关蛋白 LC3 II/I、p62、Beclin-1 及钙化指标 BMP-2、ALP 蛋白表达水平

收集分组干预后的 HUVEC 及 ApoE^{-/-}小鼠主动脉, 加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 1 h, 4℃ 12000 g 15 min 离心收集细胞及组织裂解物样本缓冲液, 100℃ 变性 8 min 后 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 再以 350 mA 恒流转印至 PVDF 膜。将膜置于 5% 脱脂奶粉的 TBS/T 室温封闭 1 h。再分别用

相应的兔抗鼠 CaM (1:1000)、兔抗鼠 LC3 II/I (1:1000)、鼠抗鼠 p62 (1:1000)、兔抗鼠 BMP-2 (1:1000)、兔抗鼠 ALP (1:1000)、鼠抗鼠 β-actin (1:1000) 4℃ 孵育过夜。次日 TBS/T 洗涤 10 min ×3 次, 采用 HRP 的羊抗兔 IgG (1:5000)、HRP 标记的羊抗鼠 (1:1000), 37℃ 孵育 1 h, TBS/T 洗涤 10 min ×3 次, ECL 显色系统定影显色, 扫描分析条带灰度值, 以灰度值定量代表蛋白表达水平。

1.9 组织 HE 及 Von Kossa 染色

分别对各干预组主动脉斑块区节段取材, HE 染色评价 As 的程度; 然后行组织 Von Kossa 染色评价斑块性质及钙化。具体步骤: ①4% 多聚甲醛固定 30 min; ②滴加 2% AgNO₃, 紫外照射 30 min, 去离子水洗 3 次; ③硫代硫酸钠处理 5 min, 再次去离子水洗 3 次; ④中性红染色 3 min; 脱水、封片。倒置显微镜下观察, 进行统计学分析。

1.10 统计学分析

实验数据采用统计软件 SPSS 17.0 分析。正态分布数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1, 25-(OH)₂D₃ 增强 HUVEC 自噬水平及减少 HUVEC 钙化

荧光显微镜观察结果显示: 空白组荧光斑点较少, 对照组的总斑点数较空白组增加, 黄色斑点增多, 红色斑点极少, 表明自噬增强, 而自噬流不畅通; 1, 25-(OH)₂D₃ 干预组的总斑点数较对照组增加, 且红色斑点较多, 黄色斑点较对照组少, 表明自噬增强, 自噬流通畅 (图 1)。

透射电镜观察 HUVEC 中自噬小体及钙化, 结果显示 1, 25-(OH)₂D₃ 干预组及对照组 HUVEC 中自噬小体增多, 对照组钙化沉积 (图 2)。

Western blot 结果显示: 与空白组比较, 对照组 LC3 II/I 比值、p62 表达增加 ($P < 0.05$), CaM 表达差异无统计学意义; 与对照组相比, 1, 25-(OH)₂D₃ 干预组小鼠主动脉 LC3 II/I 和 CaM 表达增多, p62 表达减少 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.2 1, 25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号抑制 HUVEC 钙化

Western blot 结果显示: 与对照组及空载体组比较, CaM 沉默组的 BMP-2、ALP 蛋白表达水平升高, 而 CaM 过表达组 BMP-2、ALP 表达减少; CaM 沉默

组的 BMP-2、ALP 蛋白表达水平均高于 CaM 过表达组 ($P<0.05$; 图 4)。

细胞茜素红染色结果显示 CaM 过表达组钙沉积明显减少, 而 CaM 沉默组钙沉积程度明显增加, 高于对照组及空载体组 (图 5)。

Ca^{2+} 浓度检测结果显示: 对照组、空载体组、CaM 过表达组与 CaM 沉默组的 Ca^{2+} 浓度分别为 (0.031 ± 0.003) mol/g 蛋白、 (0.029 ± 0.03) mol/g 蛋白、 (0.017 ± 0.003) mol/g 蛋白、 (0.042 ± 0.003) mol/g

蛋白比; 与对照组及空载体组比较, CaM 过表达组 Ca^{2+} 浓度降低 ($P<0.05$), CaM 沉默组 Ca^{2+} 浓度升高 ($P<0.05$; 图 6)。

2.3 1, 25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号调控 ApoE^{-/-} 小鼠 As 自噬抑制斑块钙化

Western blot 结果显示: 与对照组相比, CaM 过表达组及 CaM 沉默组 LC3 II/I 增多, CaM 沉默组 BMP-2 水平高于对照组及 CaM 过表达组 ($P<0.05$; 图 7)。

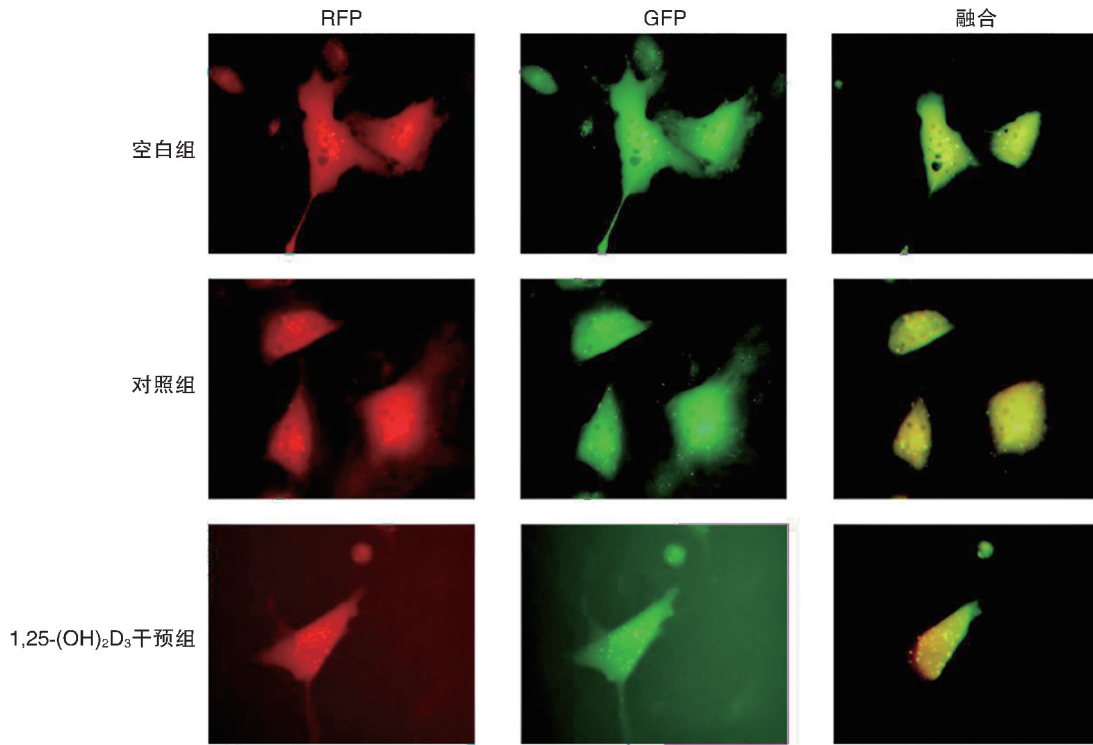


图 1. 1,25-(OH)₂D₃ 增强 HUVEC 自噬流的免疫荧光观察 (400×, n=5) GFP⁺RFP⁺ Merge 后即黄色斑点为自噬体, GFP⁻RFP⁺ Merge 后即红色斑点指示自噬溶酶体。

Figure 1. Representative images of fluorescent LC3 puncta after HUVEC were intervened with 1,25-(OH)₂D₃ (400×, n=5)

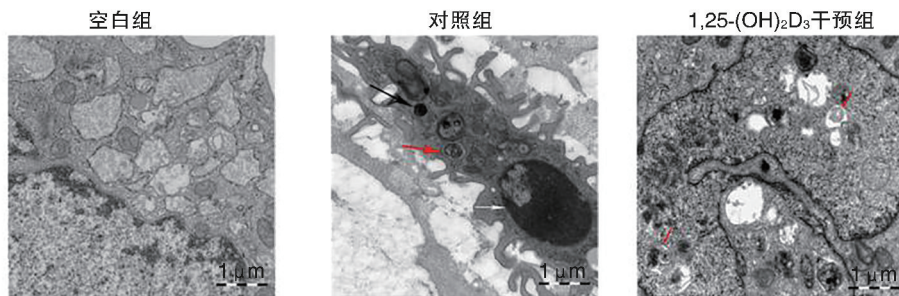


图 2. 透射电镜观察 1,25-(OH)₂D₃ 对 HUVEC 自噬小体及钙化的影响 (n=5) 红色箭头所示为自噬小体, 白色箭头所示为细胞核, 黑色箭头所示为钙沉积。

Figure 2. TEM showing autophagosomes and calcium depositions in HUVEC after intervened with 1,25-(OH)₂D₃ (n=5)

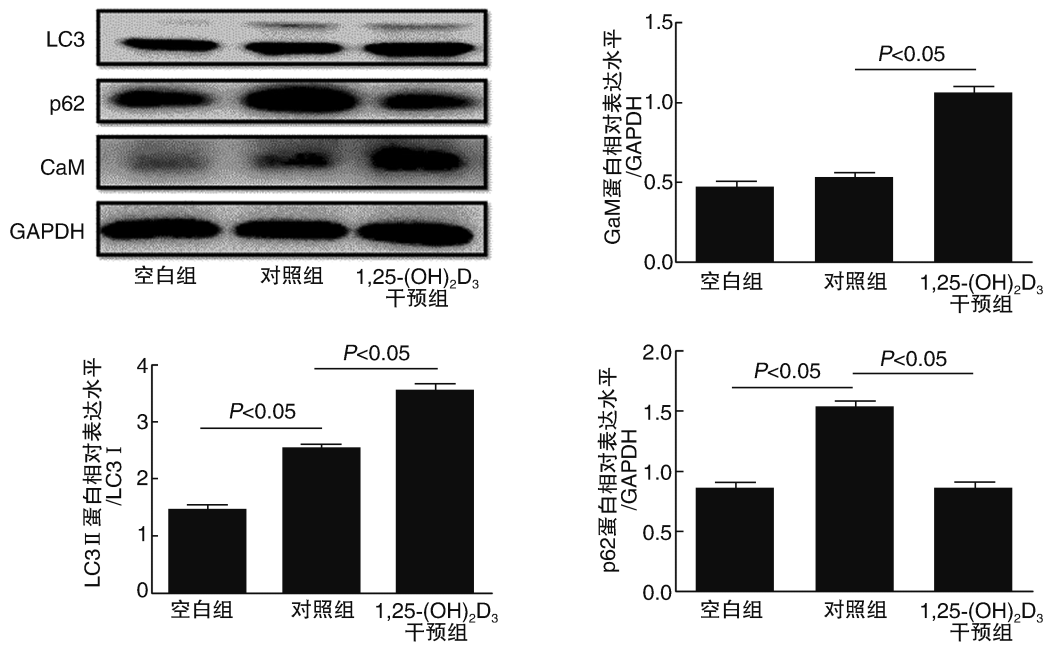


图 3. 1,25-(OH)₂D₃ 对各组 HUVEC 自噬相关蛋白 LC3、p62 及 CaM 蛋白表达水平的影响

Figure 3. Western blot showed effects of 1,25-(OH)₂D₃ on the expression of LC3 II/I, p62 and CaM in HUVEC of each group

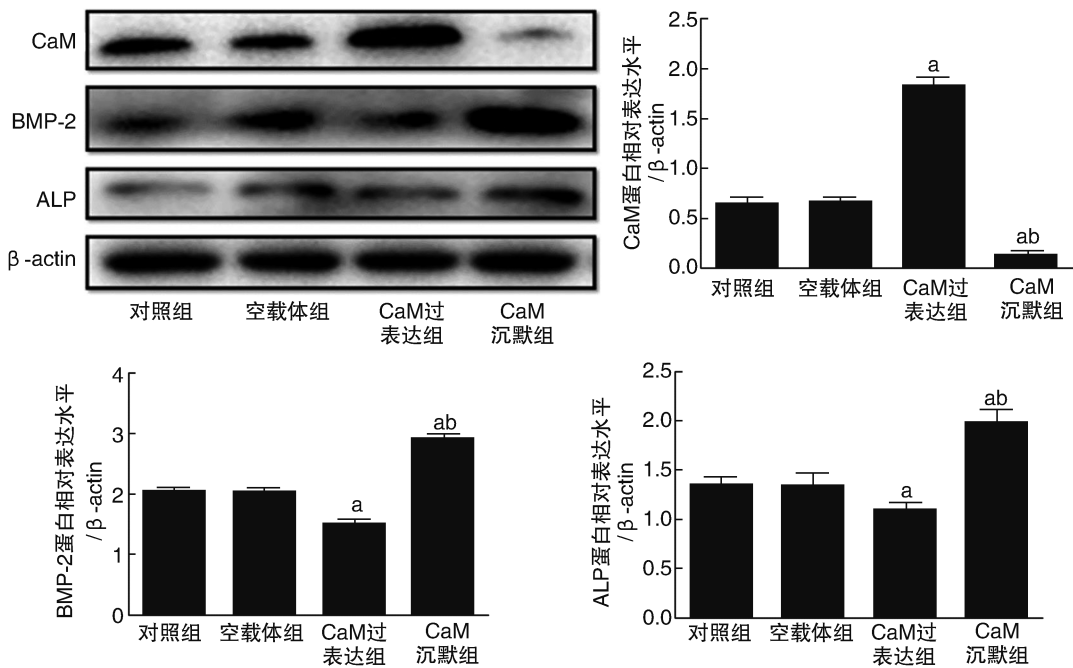


图 4. 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号对 HUVEC 钙化相关蛋白 BMP-2、ALP 表达水平的影响 a 为 P<0.05, 与对照组和空载体组比较; b 为 P<0.05, 与 CaM 过表达组比较。

Figure 4. The effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the expression level of BMP-2 and ALP of HUVEC calcification associated protein through Ca²⁺/CaM signal

透射电镜观察 ApoE^{-/-}小鼠 As 斑块中自噬小体及钙化结果显示:CaM 过表达组及 CaM 沉默组自噬

小体增多, CaM 沉默组可见钙沉积(图 8)。

ApoE^{-/-}小鼠胸主动脉 HE 及 Von Kossa 染色结

果显示,各组均可见 As 斑块形成,对照组及 CaM 沉默组管腔结构紊乱,内膜连续性破坏,为弥漫斑块。CaM 过表达组斑块面积最小。Von kossa 染色结果

显示:CaM 沉默组斑块中可见明显钙化灶;对照组及 CaM 过表达组斑块未见钙化灶(图 9)。

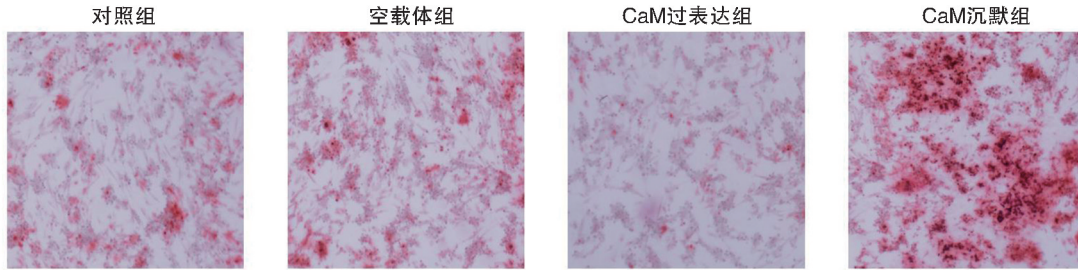


图 5. 茜素红染色观察 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号对 HUVEC 钙沉积的影响(100×) 染色越深表示钙沉积越明显。
 Figure 5. Alizarin red staining was used to observe the effect of 1,25-(OH)₂D₃ on calcium deposition in HUVEC by Ca²⁺/CaM signal(100×)

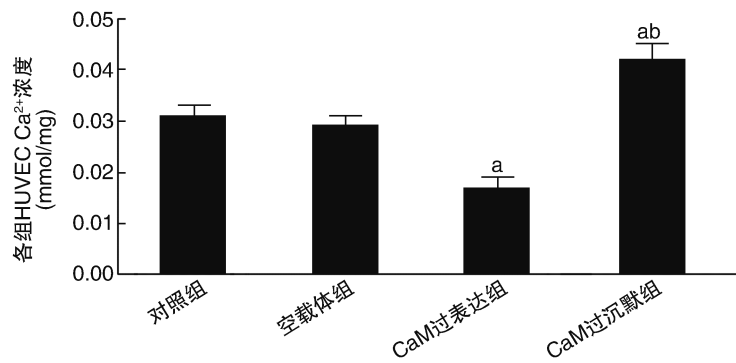


图 6. 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号对各组 HUVEC 中 Ca²⁺浓度的影响 a 为 P<0.05,与对照组和空载体组比较;b 为 P<0.05,与 CaM 过表达组比较。

Figure 6. Effects of 1,25-(OH)₂D₃ on Ca²⁺ concentration in HUVEC by Ca²⁺/CaM signal

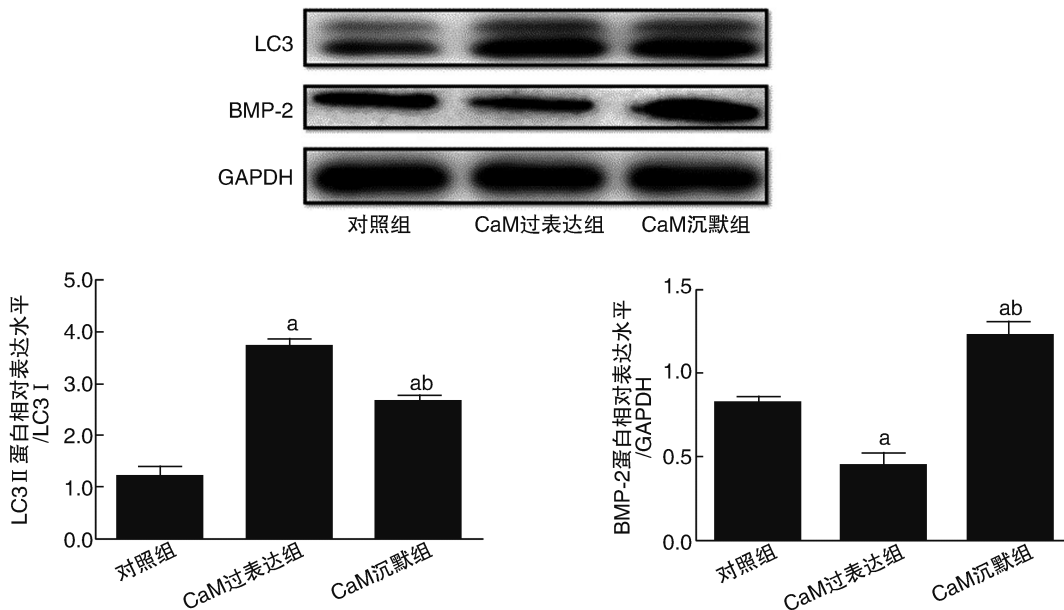


图 7. 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号调控 ApoE^{-/-}小鼠主动脉自噬相关蛋白 LC3 及 BMP-2 蛋白表达水平 a 为 P<0.05,与对照组比较;b 为 P<0.05,与 CaM 过表达组比较。

Figure 7. 1,25-(OH)₂D₃ regulates the expression of autophagy-related protein LC3 and BMP-2 in ApoE^{-/-} mice aorta through Ca²⁺/CaM signal

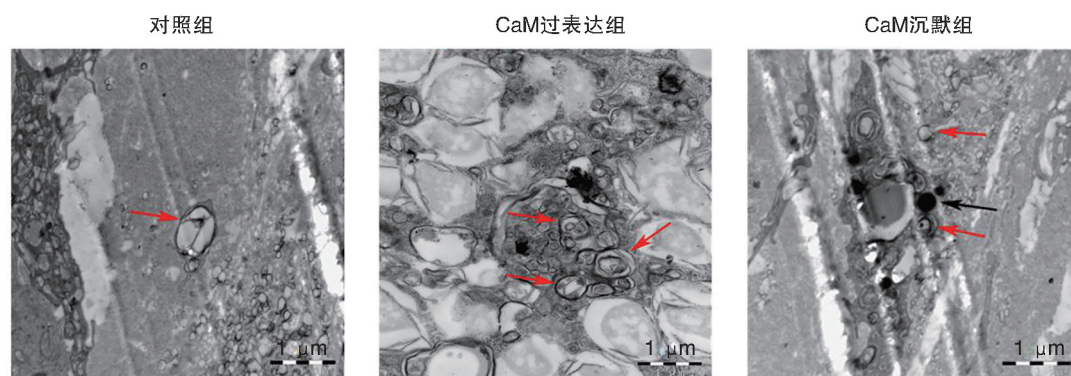


图 8. 透射电镜观察 1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号影响 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块中自噬小体数量 红色箭头所示为自噬小体,黑色箭头所示为钙沉积。

Figure 8. Transmission electron microscopy was used to observe the effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the number of autophagic bodies in aortic plaques of ApoE^{-/-} mice by Ca²⁺/CaM signal

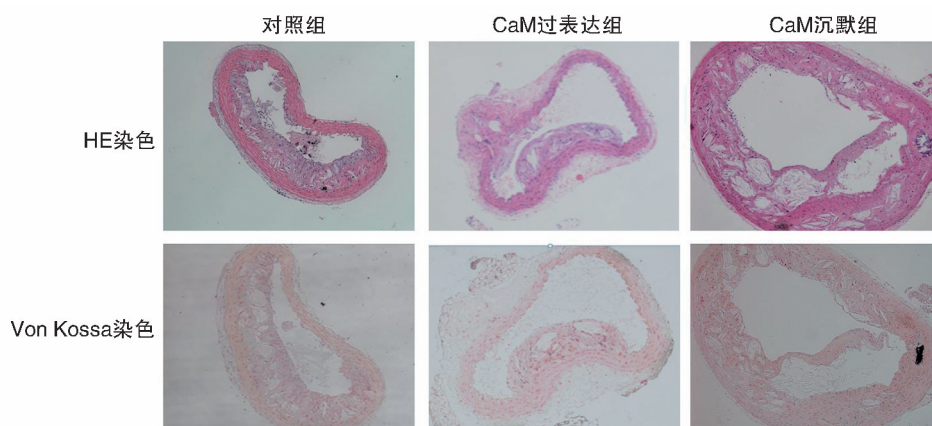


图 9. 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块 HE 染色及斑块中钙化水平的 Von Kossa 染色结果(40×) 光镜下血管内 As 钙化斑块内可见黑色颗粒,无钙化的斑块内无黑色颗粒。

Figure 9. HE staining showed the formation of atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice and Von Kossa staining showed calcium depositions in plaques(40×)

3 讨论

血管钙化可发生在血管中膜和内膜,已有研究表明^[14-15],发生在中膜的钙化可以使斑块平滑肌纤维帽不易破裂,斑块更稳定;而来源于内皮细胞的钙化容易导致斑块破裂,从而引发严重心脑血管事件。我们前期研究阻断平滑肌细胞自噬后,自噬小体和溶酶体不能融合降解,细胞内、外的自噬小体堆积,同时平滑肌细胞外钙沉积增加^[16-17],而内皮细胞自噬与内膜钙化尚无相关报道。血管内皮细胞作为血管表面的单层细胞,其发生异常自噬时,出现类似于骨发育和软骨形成的过程,进而发生内膜钙化病灶,因此阐明内皮细胞自噬及血管钙化发病机制对防治心脑血管不良事件具有重要意义。

诸多体外实验发现一些新的或已存的药物能激活或抑制自噬信号,这表明自噬可能成为多种疾病的治疗靶点^[10-11]。

CaM 为一条肽链的单体蛋白,由 148 个氨基酸组成单条多肽,相对分子质量为 16.7 kDa。在每个钙调蛋白分子内,有 4 个 Ca²⁺ 结合位点,当 Ca²⁺ 达到一定浓度时,CaM 与 Ca²⁺ 结合导致构象改变,激活 Ca²⁺/CaM 复合物,参与自噬小体的降解。通常细胞质游离 Ca²⁺ 浓度很低,1,25-(OH)₂D₃ 是一种脂溶性维生素,是维生素 D₃ 在体内经过两次羟化作用转变而来,1,25-(OH)₂D₃ 作用于细胞时可能导致 Ca²⁺ 从钙库释放到细胞质,激活 Ca²⁺/CaM 信号通路。已有研究表明^[12],在体给予 1,25-(OH)₂D₃ 上调自噬相关基因 Beclin-1、Atg5 转录表达,诱导自

噬。因此,我们提出如下假说:1,25-(OH)₂D₃ 通过 Ca²⁺/CaM 信号调控自噬抑制 As 斑块及钙化的形成与进展。1,25-(OH)₂D₃ 抑制 As 内膜钙化形成是否与自噬有关目前尚不清楚。

本实验分别在体内和体外探讨 1,25-(OH)₂D₃ 是否通过 Ca²⁺/CaM 信号调控自噬抑制钙化形成。结果显示,给予 1,25-(OH)₂D₃ 干预 HUVEC 后,细胞 Ca²⁺ 与 CaM 上调,LC3 II/I 比值增高,p62 表达水平减少;过表达 CaM 后,HUVEC 中 LC3 II/I 比值较 CaM 沉默组降低,p62 表达水平也减少;自噬双标腺病毒感染 HUVEC 观察自噬流也发现,在对照组基础上加入 1,25-(OH)₂D₃ 干预后,红色斑点的自噬溶酶体较多,黄色斑点的自噬小体减少,表明自噬水平增加的同时自噬流通畅,从而减轻了单纯炎症诱导自噬所致的自噬小体蓄积。体内实验同样提示 1,25-(OH)₂D₃ 促进自噬的形成,但 CaM 过表达组自噬流通畅,而 CaM 沉默组自噬流不通畅,钙化增加。以上结果表明,1,25-(OH)₂D₃ 上调钙离子水平以激活 CaM,活化的 CaM 结合上调的 Ca²⁺ 进而促进自噬,减轻钙化。为进一步验证是否通过 Ca²⁺/CaM 信号调控自噬抑制钙化这一假设,我们在体内、体外实验中均证明沉默表达 CaM,自噬小体数量明显增加,而对应的斑块和细胞中钙化形成明显,并且 HUVEC 及主动脉斑块中表达成骨样细胞标志性蛋白 BMP-2 和 ALP 明显增加。结果表明:CaM 沉默后予以 1,25-(OH)₂D₃ 激活自噬后并未减轻钙化,提示 1,25-(OH)₂D₃ 介导的自噬可能通过活化 CaM 影响钙化。然而,1,25-(OH)₂D₃ 是否通过 1,25-(OH)₂D₃ 受体(1,25-(OH)₂D₃ receptor,VDR)介导 Ca²⁺/CaM 信号调控自噬小体与溶酶体融合从而影响钙化形成有待进一步探讨。综上所述,1,25-(OH)₂D₃ 可能通过激活 Ca²⁺/CaM 信号影响自噬,从而抑制 As 斑块钙化的形成。该研究为进一步研究 As 钙化形成机制提供了前期基础,也为临床如何预防 As 的进程提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Choi A M K, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651-662.
- [2] Ryter S W, Lee S J, Smith A, et al. Autophagy in vascular disease[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2010, 7(1): 40-47.
- [3] Steyers C M 3rd, Miller F J Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2014,

15: 11324-11349.

- [4] 郝阳,郭晓辰,张军平,等.氧化应激和自噬在动脉粥样硬化中的作用研究新进展等[J].*中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(4): 404-410.
- [5] Klionsky DJ. A human autophagy interaction network[J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 439-441.
- [6] Nussenzweig SC, Verma S, Finkel T. The role of autophagy in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2015, 116: 480-488.
- [7] De Meyer G R, Grootaert M O, Michiels C F, et al. Autophagy in vascular disease[J]. *Circ Res*, 2015, 116: 468-479.
- [8] Schrijvers DM, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 31(12): 2787-2791.
- [9] Salabei JK, Hill BG. Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 693-703.
- [10] Bharath L P, Mueller R, Li Y, et al. Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear-stress-induced increases in nitric oxide bioavailability[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92: 605-612.
- [11] Chen Y, Bangash AB, Song J, et al. Activation of CD137 signaling accelerates vascular calcification in vivo and vitro[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 230: 198-203.
- [12] Brest P, Corcelle EA, Cesaro A, et al. Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer[J]. *Curr Mol Med*, 2015, 10: 486-502.
- [13] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMS-GC), Bush WS, Sawcer SJ, et al. Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis-the shape of things to come[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 86: 621-625.
- [14] Nakahara T, Narula J, Strauss HW. Calcification and inflammation in atherosclerosis: which is the chicken, and which is the egg? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(1): 79-80.
- [15] 戴俏武,徐绥宁,王中群,等.内质网应激介导的凋亡在糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠内膜钙化中的作用[J].*中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1093-1099.
- [16] 李晓阳,陈蕊,仲威,等. CD137 信号通过抑制自噬小体与溶酶体融合促进载脂蛋白 E^{-/-}小鼠斑块钙化形成[J].*中华心血管病杂志*, 2017, 45(12): 1078-1085.
- [17] 李波,李晓阳,仲威,等. CD137-CD137 L 信号通路通过调控小鼠血管平滑肌细胞自噬小体出胞影响动脉粥样硬化钙化形成[J].*中华心血管病杂志*, 2017, 45(1): 49-56.

(此文编辑 许雪梅)