

CD137 信号通过外泌体传递活化 T 细胞核因子 c1 介导小鼠血管平滑肌细胞钙化

王宁, 崔星钢, 杨萍, 许尧, 李波, 仲威, 邵晨, 王中群, 严金川

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] CD137 信号; 外泌体; 活化 T 细胞核因子 c1; 血管平滑肌细胞; 钙化

[摘要] **目的** 探讨外泌体在 CD137 信号诱导的小鼠血管平滑肌细胞(VSMC)钙化中的作用。**方法** 组织贴壁法提取小鼠胸主动脉 VSMC, 将细胞分为 2 组, 即对照组和 CD137 激动组, 用试剂盒提取外泌体, 并用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析及 Western blot 鉴定和分析, 荧光显微镜观察 VSMC 摄取外泌体。构建活化 T 细胞核因子 c1 (sh-NFATc1) 慢病毒载体并感染 VSMC。实验分为 3 组: 对照组外泌体处理组、CD137 激动组外泌体处理组、沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组。采用 Western blot 检测 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、骨形成蛋白 2 (BMP-2)、Runt 相关转录因子 2 (Runx-2) 蛋白表达量。Von Kossa 染色检测 VSMC 内钙盐沉积情况。**结果** Western blot 结果显示, 2 组微囊泡均表达外泌体表面标记蛋白 CD9、CD81; 电镜下外泌体成圆形和杯托状, 直径在 30~100 nm; CD137 激动组外泌体中 NFATc1 蛋白表达显著增多。与对照组外泌体处理组比较, CD137 激动组外泌体处理组钙化相关指标 BMP-2、Runx-2 蛋白表达显著增高, 同时 α -SMA 表达显著下降; 与 CD137 激动组外泌体处理组比较, 沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组 BMP-2、Runx-2 蛋白表达显著减少, α -SMA 表达显著增高。Von Kossa 染色结果显示, CD137 激动组外泌体处理组 VSMC 钙盐沉积多于对照组外泌体处理组, 而沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组钙盐沉积比 CD137 激动组外泌体处理组显著降低。**结论** CD137 信号通路通过外泌体转运 NFATc1 介导 VSMC 钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

CD137 signal mediates calcification of mouse vascular smooth muscle cells via exosomes transmitting nuclear factor of active T cell c1

WANG Ning, CUI Xinggang, YANG Ping, XU Rao, LI Bo, ZHONG Wei, SHAO Chen, WANG Zhongqun, YAN Jinchuan

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

[KEY WORDS] CD137 signal; exosomes; nuclear factor of active T cell c1; vascular smooth muscle cell; calcification

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of exosomes in the calcification of mouse vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by CD137 signal. **Methods** The mouse thoracic aorta VSMCs were performed by patch-attaching method, and VSMCs were divided into two groups: the control group, the CD137 excitation group. The exosomes were extracted by kit and identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blot. Fluorescence microscopy was used to observe VSMCs uptake of exosomes. Lentiviral vector of nuclear factor of active T cell c1 (sh-NFATc1) was constructed and infected with VSMCs. The experiments were divided into three groups: control group with exosomes treatment, CD137 excitation group with exosomes treatment, silenced NFATc1+CD137 excitation group with exosomes treatment. Western blot was used to detect the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), bone morphogenic protein 2 (BMP-2) and Runt-related transcription factor 2 (Runx-2). Calcium salt deposition in VSMCs was detected.

[收稿日期] 2018-10-13

[修回日期] 2018-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金(81670405);江苏省自然科学基金(BK20161355);江苏省研究生科研创新计划(KYCX18_2286);镇江市心血管病临床医学研究中心(SS2018008)

[作者简介] 王宁, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病及动脉粥样硬化, E-mail 为 769353653@qq.com。通信作者严金川, 博士, 教授, 研究方向为心血管疾病及动脉粥样硬化, E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。

ted by Von Kossa staining. **Results** Western blot results showed that microvesicles in both groups expressed exosomes surface marker proteins CD9 and CD81. Under electron microscopy, the exosomes were round and cup-shaped, and its diameter was about 30-100 nm. The expression of NFATc1 protein increased significantly in exosomes of CD137 excitation group. Compared with the control group exosomes treatment group, the expressions of calcification-related indicators BMP-2 and Runx-2 proteins increased significantly in CD137 excitation group with exosomes treatment, while the expression of α -SMA decreased significantly. Compared with CD137 excitation group with exosomes treatment, the expressions of BMP-2 and Runx-2 proteins decreased significantly in silenced NFATc1+CD137 excitation group with exosomes treatment, while the expression of α -SMA increased significantly. Von Kossa staining showed that VSMCs calcium deposits in CD137 excitation group with exosomes treatment were more than those in control group with exosomes treatment, while those in silenced NFATc1+CD137 excitation group with exosomes treatment were significantly lower than those in CD137 excitation group with exosomes treatment. **Conclusion** CD137 signal pathway mediates VSMCs calcification through exosome transmitting NFATc1.

血管钙化 (vascular calcification, VC) 主要发生在血管壁的内膜和中膜层,由平滑肌细胞钙磷酸盐代谢功能障碍、成骨分化和炎症刺激等引起,能够增加动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块负荷,引起斑块不稳定及破裂,导致严重的不良心血管事件^[1-2],然而其中的具体机制仍未明确。CD137 作为肿瘤坏死因子受体超家族中的一员,主要表达在 T 淋巴细胞表面,可通过与其配体 CD137L 结合,形成 CD137-CD137L 结合体 (简称 CD137 信号); CD137 信号可促进 T 淋巴细胞激活,进一步加速炎症分子释放和加重炎症反应^[3]。在炎症环境中,CD137 也可以在多种血管细胞中诱导表达,包括血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 和内皮细胞^[4]。新近研究表明 CD137 信号在 As 斑块中起重要作用,CD137 在粥样斑块中高表达,敲除 CD137 基因能使 ApoE^{-/-}小鼠 As 斑块明显减少^[5]。我们前期研究表明,激活 CD137 信号可促进 ApoE^{-/-}小鼠 As 斑块钙化的形成,体外培养的小鼠 VSMC 钙盐沉积明显增加^[6]。然而,激活 CD137 信号促进 VC 发生的具体机制仍未明确。外泌体 (exosome) 由细胞内多囊泡体衍生,当这些囊泡与质膜融合时向细胞外分泌,外泌体为直径 30~100 nm 大小的囊泡,能进行细胞间信号转递^[7]。最新研究表明外泌体与 VC 有关,一方面,VSMC 在高磷钙化液诱导后外泌体的分泌增加,分泌“钙化”外泌体诱导 VC,钙和磷可在“钙化”外泌体膜的内部和外部结合形成钙盐沉积,从而促使矿物沉积^[8];另一方面,外泌体还可以通过在细胞间传递信息来促进 VC^[9]。活化 T 细胞核因子 c1 (nuclear factor of active T cell c1, NFATc1) 被称为 VC、骨重塑的分子开关,发挥着调节破骨成骨平衡的作用^[10]。我们在前期研究中证明,NFATc1 的表达与 As 的发生发展密切相关。因此,我们猜想 CD137 信号可通过 CD137-NFATc1

轴来调控 VC,而外泌体在此过程中起关键转运的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,体质量约 20 g,由江苏大学动物实验中心提供。CD137L 重组蛋白购自上海生工生物工程有限公司; α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体购自 Sigma 公司;骨形成蛋白 2 (bone morphogenic protein 2, BMP-2) 抗体和 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx-2) 抗体购自 Cell Signing Technology 公司;Lipo2000 和 TRIzol 试剂购自美国 Inventrogen 公司;CD9、CD81 抗体购自 Bioworld 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自博士德生物有限公司;NFATc1 抗体购自 Abcam 公司;Von Kossa 钙化染色试剂盒购自 Solarbio 公司;QuantiChrom 钙测定试剂盒购自美国 Bioassay 公司;ExoQuick-TC (外泌体快速抽提试剂盒) 购自 System Biosciences 公司;Exosome-free FBS (无外泌体胎牛血清) 购自 Bioind 公司;293T 细胞购于中国科学院。

1.2 细胞培养与处理

(1) 原代小鼠 VSMC 的分离、培养、干预: C57BL/6J 小鼠 VSMC 常规分离、培养,留取 3~8 代细胞,置于完全培养基 (DMEM 培养基+10%胎牛血清) 培养,待细胞融合至 60%,分为:①对照组;② CD137 激动组:加入 CD137L 重组蛋白 (终浓度 10 mg/L)。收集以上 2 组培养上清提取外泌体,所提纯外泌体分别标为 Control-Exo 和 CD137-Exo,用作电镜、纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 和 Western blot 检测。(2) 将 VSMC 分 3 组:①对照组 (PLKO. 1-GFP);② CD137 激动组

(PLKO.1-GFP+CD137);③沉默 NFATc1+CD137 激动组(PLKO.1-shNFATc1+CD137)。分别提取以上3组细胞培养上清中的外泌体,分别标记为(PLKO.1-GFP)-Exo 对照组外泌体、CD137 激动组外泌体、(PLKO.1-shNFATc1+CD137)-Exo 即沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体,备用。(3)以 5×10^4 个/孔细胞种入6孔板,细胞融合至50%时,随机分为3组:①对照组外泌体处理组:加入200 mg/L (PLKO.1-GFP)-Exo;②CD137 激动组外泌体处理组:加入200 mg/L (PLKO.1-GFP+CD137)-Exo;③沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组:加入200 mg/L (PLKO.1-shNFATc1+CD137)-Exo;处理36 h 提取蛋白,用 Western blot 检测 BMP-2 和 Runx-2 蛋白表达水平。细胞融合至80%后改用钙化诱导液(DF12+10 mmol/L β -磷酸甘油钠+5%胎牛血清),隔天换液,继续培养14天,用于 Von Kossa 染色。细胞培养实验使用去外泌体胎牛血清,以排除血清中外泌体的影响。

1.3 外泌体提纯

按“1.2”下方法培养 VSMC,收集培养上清至高压灭菌的15 mL 离心管,放置在预冷离心机中(超速冷冻离心机,Thermo Fisher ST 16R,Thermo Fisher 公司),3000 g 离心力离心15 min 以去除细胞和细胞碎片。将上清转移到高压灭菌的15 mL 离心管中,加入 ExoQuick-TC Exosome 预混液(Exosome Isolation Reagent,SBI 公司),用振荡器将离心管中的液体充分混匀,混匀后放入4 °C 的冰箱中过夜沉淀。4 °C 1500 g 离心力离心30 min。离心后离心管底部有白色沉淀,外泌体就在底部沉淀中。弃上清,再将离心管中的沉淀物1500 g 离心力离心5 min,弃上清,注意不要摇晃沉淀的白色物质。加入300 μ L 高压灭菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)重悬稀释,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测外泌体蛋白浓度,然后将所分离的外泌体置于-80 °C 冰箱冷冻备用。

1.4 透射电镜和纳米颗粒跟踪分析仪观测外泌体

将10 μ L 外泌体滴于铜网上,静置2 min,用滤纸将铜网边缘的液体擦净,在铜网面上滴加10 μ L 乙酸双氧铀,染色1 min。利用 CM100 透射电子显微镜(Philips 公司)观察、拍照。粒子浓度和粒径分布由纳米颗粒跟踪分析仪(NanoSight LM10)观察分析。

1.5 荧光显微镜观察外泌体被 VSMC 摄取

VSMC 内吞外泌体实验:用膜染料 PKH-26(红色)标记外泌体,将经标记的外泌体悬液通过100-

kDa MWCO 中空纤维膜(Millipore 公司),1500 g 离心力离心15 min,重复2次(去除未结合的染料)。在24孔板中接种4个孔 VSMC(50000 个细胞/孔),在细胞贴壁后加入带有荧光素的外泌体(200 mg/L),共培养6、12、18、24 h。然后用 PBS 洗涤细胞并在4%多聚甲醛中固定15 min,用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色后使用荧光显微镜观察拍照。

1.6 沉默 NFATc1 病毒载体构建并感染 VSMC

shNFATc1 的上游引物序列为5'-CCGGCCCCGTCCAAGTCAGTTTCTATCTCGAGATAGAACTGACTTGGACGGGTTTTTG-3',下游引物序列为5'-AATTCAAAAACCCGTCCAAGTCAGTTTCTATCTCGAGATAGAACTGACTTGGACGGG-3'。合成的序列置于 PCR 仪上,反应条件为95 °C 100 min,退火生成双链 DNA。用 EcoR I 和 Age I 限制性内切酶酶切上述获得的目的片段及空载体,酶切产物经凝胶电泳分离,以凝胶回收试剂盒回收目的片段,使用 T4 连接酶将目的 DNA 片段及空载体在室温下连接过夜。将上述连接产物导入感受态细胞后,涂板放入37 °C 培养箱中,14 h 后挑取阳性单克隆扩增,提取质粒,将质粒送上海生工生物工程公司测序。取生长良好的293T 细胞,以每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板。第2天细胞覆盖率达70%~80%后,根据慢病毒包装体系将经测序验证的目的基因、辅助质粒 PSPAX2 及 PMD2G 共转染至293T。8 h 后更换含10%胎牛血清的完全培养基,收集48 h 和72 h 的上清液,4 °C 离心1 min 去除杂质,分装后在-80 °C 保存备用。将 VSMC 接种于6孔板内,待融合度达70%时,更换新鲜培养基,每孔加入300 μ L 病毒及终浓度为8 mg/L 的溴化己二甲铵(聚凝胺)。24 h 后重复感染1次。48 h 后使用2.5 mg/L 嘌呤霉素筛选稳定表达目的基因的细胞株:对照组(PLKO.1-shGFP)、沉默 NFATc1 细胞株(PLKO.1-shNFATc1)。筛选出空载对照细胞株、shRNA 稳定表达的细胞株(PLKO.1-shNFATc1),分别作为对照组、沉默 NFATc1 组,采用 Western blot 技术检测 NFATc1 蛋白表达水平。

1.7 Western blot 分析

(1)检测外泌体中 CD9、CD81、NFATc1 蛋白的表达:取“1.3”下实验中重悬的外泌体50 μ L 至1.5 mL 离心管中,加入100 μ L RIPA 裂解液,将离心管放在冰上,每5 min 震荡1次,震荡1 h。加入5倍稀释的上样缓冲液37.5 μ L,煮沸8 min。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定的外泌体中总蛋白浓度,

分别取 30 μg 上样,用 10%分离胶行 SDS-PAGE 分离,350 mA、90 min,将胶上的蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),用 5%脱脂牛奶在摇床上室温摇 1 h 将膜封闭,分别加兔抗小鼠抗体 CD9(1:500)、CD81(1:500)、 β -actin(1:2000)、NFATc1(1:1000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天回收抗体,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。ECL 显色系统定影显色,观察杂交条带。(2)提取各组外泌体处理的 VSMC 蛋白,取 10 μg 上样,重复 Western blot 实验,检测 α -SMA、BMP-2(1:1000)、Runx-2(1:2000) 蛋白表达。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对 Western blot 条带进行灰度分析。

1.8 Von Kossa 染色

吸去细胞上清,用 PBS 漂洗 3 遍,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,滴加 2% AgNO_3 ,紫外线照射 1 h,去离子水漂洗 3 次,硫代硫酸钠处理 5 min,去离子水漂洗 3 次后中性红染色 3 min,去离子水漂洗 3 次,加入 200 μL 甘油,倒置显微镜下观察,拍照。

1.9 钙含量测定

将“1.2(3)”下培养的 VSMC,用 PBS 洗涤后,用 0.6 mol/L HCl 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 VSMC 过夜。吸去 HCl 处理后上清液,将剩余的细胞层溶于 0.1 mol/L NaOH 和 0.1%SDS 中进行蛋白质浓度分析。使用

QuantiChrom 钙测定试剂盒对 HCl 处理后的上清液中的钙含量进行比色分析,并将其与蛋白质含量标准化后比较。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,计量数据符合正态分布,均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSMC 培养上清中提取的外泌体的鉴定

透射电镜观察 VSMC 外泌体大小形态:外泌体大小 30~100 nm,为双层膜结构的盘状囊泡,部分成圆形;2 组细胞分泌的外泌体均表达外泌体特异性表面标志物 CD81、CD9(图 1);NTA 检测结果显示提取的微囊泡粒径主要落在 30~100 nm;结果显示在 VSMC 培养上清中所提取的微囊泡为外泌体。

2.2 激动 CD137 信号后对外泌体中 NFATc1 表达的影响

与对照组外泌体比较,CD137 激动组外泌体中 NFATc1 的蛋白表达水平明显增高($P<0.05$;图 2)。表明在 VSMC 中激动 CD137 能上调 NFATc1 在外泌体中表达。

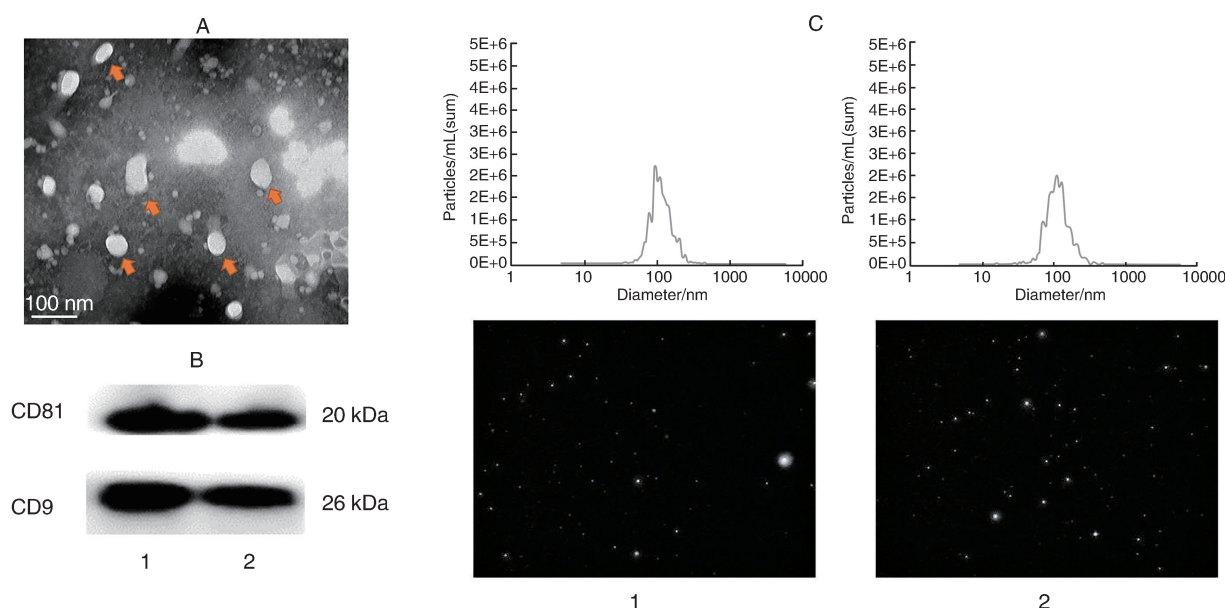


图 1. 小鼠 VSMC 外泌体的鉴定(59000 \times) A 为透射电镜观察外泌体,箭头所指为外泌体;B 为 Western blot 检测外泌体特异性表面标志蛋白 CD9 和 CD81;C 为 2 组外泌体 NTA 法粒径检测结果。1 为对照组外泌体;2 为 CD137 激动组外泌体。

Figure 1. Identification of exosomes from mouse VSMC (59000 \times)

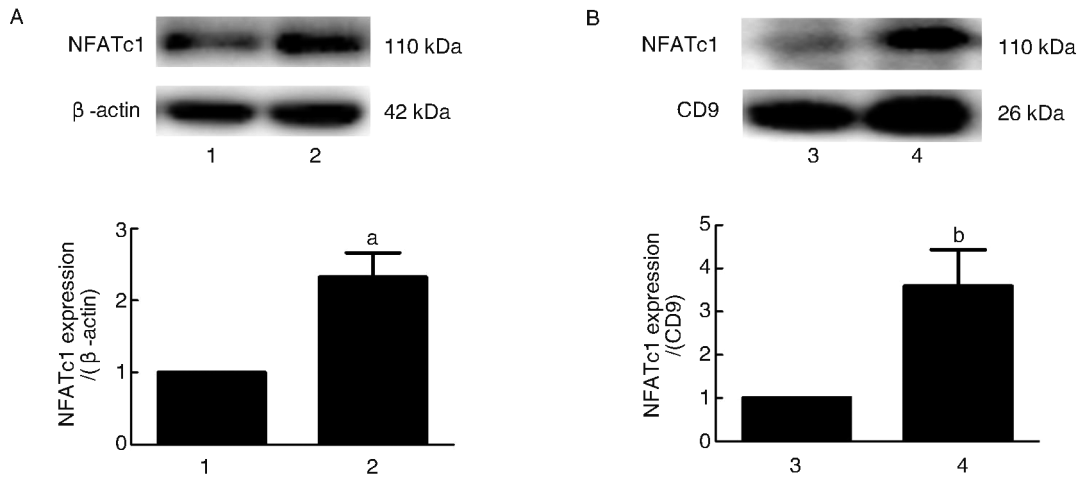


图 2. VSMC 和外泌体中 NFATc1 表达水平 A 为 CD137 信号激动后细胞内 NFATc1 蛋白的表达水平; a 为 $P < 0.05$, 与对照组细胞比较。B 为 CD137 信号激动后外泌体中 NFATc1 蛋白的表达水平; b 为 $P < 0.05$, 与对照组外泌体比较。1 为对照组细胞; 2 为 CD137 激动组细胞; 3 为对照组外泌体; 4 为 CD137 激动组外泌体。

Figure 2. Expressions of NFATc1 in VSMC and exosomes

2.3 提纯的外泌体被 VSMC 摄取

用 PKH-26 (红色荧光) 标记外泌体并与 VSMC 共培养 6、12、18、24 h, 观察到红色荧光点向蓝色细胞核周围聚集, 即外泌体被 VSMC 摄取。荧光显微镜下观察可见 6 h 开始核周有外泌体聚集, 到 24 h 外泌体被 VSMC 有效摄取 (图 3)。

2.4 沉默 NFATc1 的细胞株外泌体中 NFATc1 的表达受抑制

与 CD137 激动组细胞及外泌体比较, 沉默 NFATc1+CD137 激动组细胞及外泌体中的 NFATc1 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$; 图 4), 提示细胞中沉默 NFATc1 有效, 同时外泌体中 NFATc1 的表达亦

被有效抑制。

2.5 外泌体对 VSMC 中 α-SMA、BMP-2 和 Runx-2 表达的影响

Western blot 分析显示, 与对照组外泌体比较, CD137 激动组外泌体能显著下调 VSMC 中 α-SMA 蛋白的表达, 同时显著上调 BMP-2 和 Runx-2 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。而与 CD137 激动组外泌体处理组比较, 用沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理 VSMC, 其 BMP-2 和 Runx-2 蛋白表达显著下调, 同时 α-SMA 蛋白表达上调 ($P < 0.05$; 图 5)。提示 CD137 信号激动后分泌的外泌体通过 NFATc1 促进 VSMC 成骨表型转化。

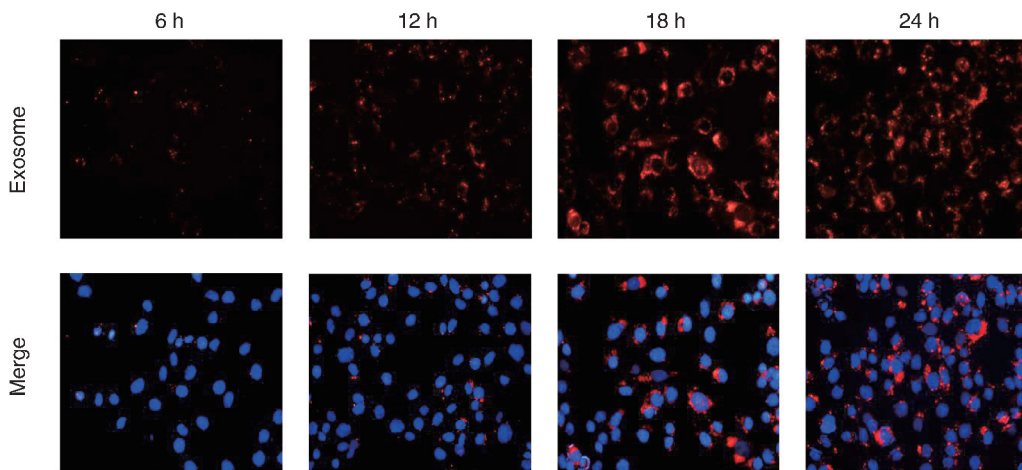


图 3. 外泌体被 VSMC 摄取 (400×) PKH26 (红色) 标记外泌体, DAPI (蓝色) 标记 VSMC 细胞核, 红色荧光点在蓝色细胞核周围聚集, 即外泌体被摄取。

Figure 3. Exosomes were internalized by VSMC (400×)

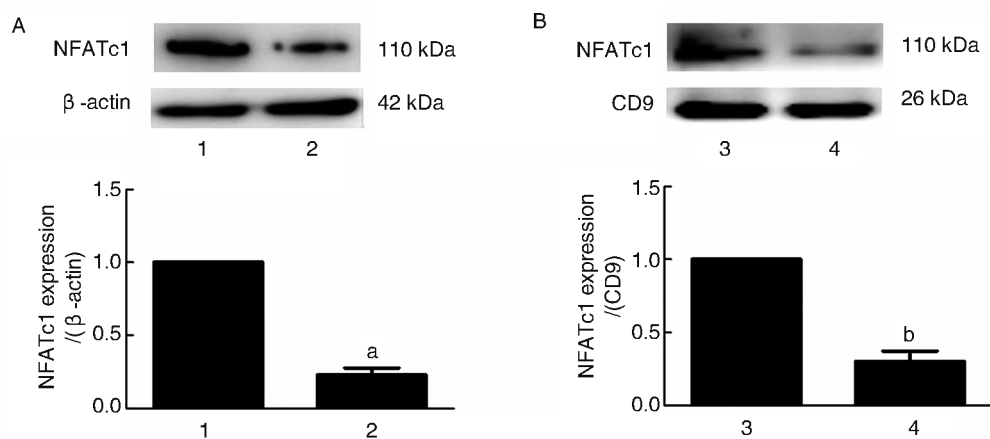


图 4. 病毒沉默 NFATc1 的效率和 2 组外泌体中 NFATc1 的表达水平 A 为沉默细胞株中 NFATc1 检测结果; a 为 $P < 0.05$, 与 CD137 激动组细胞比较。B 为沉默细胞株外泌体中 NFATc1 检测结果; b 为 $P < 0.05$, 与 CD137 激动组外泌体比较。1 为 CD137 激动组细胞; 2 为沉默 NFATc1+CD137 激动组细胞; 3 为 CD137 激动组外泌体; 4 为沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体。

Figure 4. Efficiency of virus silencing NFATc1 and expression level of NFATc1 in exosomes of two groups

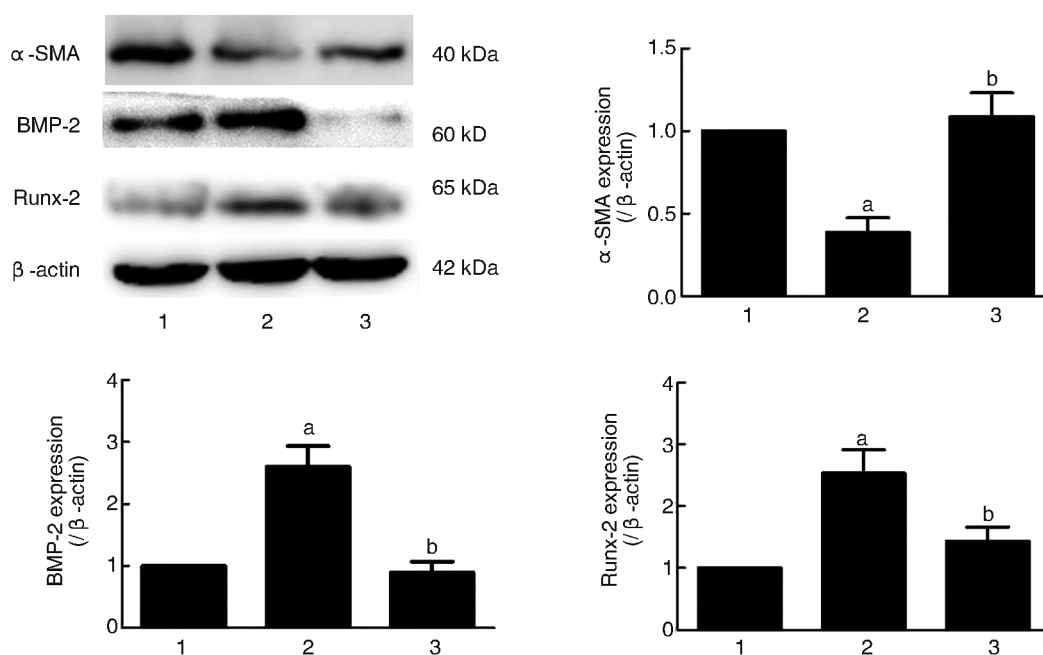


图 5. 外泌体对 VSMC 中 α -SMA、BMP-2 和 Runx-2 蛋白表达的影响 1 为对照组外泌体处理组; 2 为 CD137 激动组外泌体处理组; 3 为沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组外泌体处理组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CD137 激动组外泌体处理组比较。

Figure 5. Effects of exosomes on the expressions of α -SMA, BMP-2 and Runx-2 proteins in VSMC

2.6 外泌体对 VSMC 钙化发生及钙盐沉积的影响

将各组 VSMC 进行 Von Kossa 染色, 结果显示 CD137 激动组外泌体处理组 VSMC 黑色钙颗粒沉积显著增多, 与对照组外泌体处理组比较, 钙化面积增大 3.47 倍 ($P < 0.05$)。与 CD137 激动组外泌体处理组比较, 沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组钙盐沉积明显降低 ($P < 0.05$; 图 6)。提示 CD137 信号激动后分泌的外泌体通过 NFATc1 促进 VSMC

成骨表型转化。

3 讨论

血管钙化是 AS、慢性肾病和糖尿病患者常见的晚期并发症, 显著增加患者心血管事件的发病率和死亡率。VC 与骨形成过程相似, 主要由动脉壁中的磷酸钙沉积导致, 是一种主动调节的基质矿物质

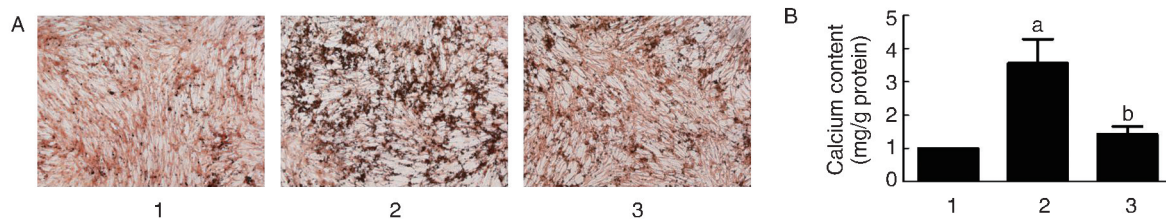


图 6. 外泌体对 VSMC 钙化发生及钙盐沉积的影响(200×) A 为 Von Kossa 染色结果;B 为钙含量测定结果。1 为对照组外泌体处理组;2 为 CD137 激动组外泌体处理组;3 为沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组外泌体处理组比较;b 为 $P < 0.05$, 与 CD137 激动组外泌体处理组比较。

Figure 6. Effects of exosomes on calcification and calcium deposition in VSMC (200×)

代谢过程^[11-12]。这种现象包括 VSMC 在慢性肾病、糖尿病、衰老或炎症等环境下的收缩表型去分化和向成骨表型转化。成骨表型的特征包括:血管壁中成骨标志物如 BMP-2、Runx-2 等水平的增加,内源性矿化抑制剂基质 γ -羧基谷氨酸酸性蛋白和胎球蛋白的降低。其中 BMP-2 是转化生长因子 β 超家族成员,有诱导骨形成的作用,Runx-2 是调节成骨细胞和软骨细胞分化的核心转录因子,这些指标的上调都能促进钙化的发生^[12]。CD137 是淋巴细胞表面重要的共刺激分子。Olofsson 等^[4]发现 CD137 在人类 As 斑块中高表达,而在正常平滑肌中表达较少,但在受到炎症刺激后可高表达 CD137。我们前期研究发现激活 CD137 信号通路后,能促进平滑肌细胞的钙化发生及 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样斑块内钙化灶显著增多,然而其中具体机制仍未明确。

外泌体是一类能进行细胞间信息传递的新型高效的通信介质,广泛存在于各种体液中,能特异性装载细胞内的 RNA、蛋白质和活性因子等成分。外泌体在心血管疾病中发挥重要的作用。最近的研究^[13]揭示在 As 钙化中,VSMC 能向细胞外分泌外泌体,介导矿物沉积加速和钙化发生;另一方面外泌体能通过基因信息的转运来促进 VC。但外泌体促进 VC 的具体作用机制仍未明确。因此本实验阐述外泌体在 CD137 信号介导的平滑肌细胞钙化过程中的作用。

首先,我们用透射电镜观察提取的细胞外囊泡的大小形态,检测外泌体特异性标记物,明确所提取囊泡为外泌体。随后我们进行了 2 组外泌体中成分的检测,经过筛查发现 CD137 激动组外泌体中的 NFATc1 比对照组外泌体显著上调;根据我们的前期研究,CD137 信号能通过上调 NFATc1 促进 VSMC 的表型转化,即收缩表型去分化,向“合成”型转化^[14]。NFATc1 是骨调节中的一个关键因子,因此我们进一步研究 CD137 信号激动后分泌的外泌体

在 VSMC 成骨表型分化中的作用。将各组外泌体与 VSMC 共培养,结果显示 CD137 激动组 VSMC 分泌的外泌体能使 VSMC 中的成骨表型蛋白 BMP-2 和 Runx-2 蛋白的表达显著增加,同时抑制 α -SMA 蛋白的表达;而在沉默 NFATc1 的同时激动 CD137 信号后分泌的外泌体不能上调 VSMC 中 BMP-2 和 Runx-2 的蛋白表达,亦不能下调 α -SMA 蛋白。此结果提示:在 VSMC 中激动 CD137 信号能通过分泌外泌体来向周围的 VSMC 转运 NFATc1 介导成骨表型转化;而 VSMC 从“收缩”到“合成”状态的表型转换,能促进血管病变,包括再狭窄、As 和 VC。目前认为 VSMC 向成骨样细胞表型转化并表达成骨样细胞标志性蛋白如 BMP-2、Runx-2 是 VC 发生的重要环节。Von Kossa 染色检测结果显示,CD137 激动组外泌体处理的 VSMC 内钙盐沉积面积及钙离子含量比对照组外泌体处理组显著增加;与 CD137 激动组外泌体处理组比较,沉默 NFATc1+CD137 激动组外泌体处理组钙盐沉积面积和钙离子含量明显下降;这与钙化相关蛋白表达结果一致。提示激动 CD137 信号可能通外泌体来介导 VSMC 成骨样表型转化及钙化形成,NFATc1 是此过程的关键因子。

综上所述,本研究证实 CD137 信号通过外泌体转运 NFATc1 介导小鼠 VSMC 钙化形成。本研究为阐明 CD137 信号在 VC 中的作用机制提供了理论依据,也为进一步干预 As 斑块钙化形成提供了新的靶点及思路。

[参考文献]

- [1] Geisel MH, Bauer M, Hennig F, et al. Comparison of coronary artery calcification, carotid intima-media thickness and ankle-brachial index for predicting 10-year incident cardiovascular events in the general population [J]. Eur Heart J, 2017, 38(23): 1815-1822.

(下转第 1244 页)

- [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 311-314.
- [7] 刘粉叶. 益肾活血胶囊对高同型半胱氨酸血症所致兔动脉粥样硬化相关炎症因子表达调节的研究[D]. 山东大学, 2008.
- [8] Ma ZN, Liu Z, Wang Z, et al. Supplementation of American ginseng berry extract mitigated cisplatin-evoked nephrotoxicity by suppressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 110: 62.
- [9] Kilnam K, Soojin H, Weonjong Y, et al. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages.[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1): 369-375.
- [10] 杨娟, 王洪新, 张英杰, 等. TLR4/NF- κ B 信号通路在黄芪甲苷抑制异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(7): 577-582.
- [11] 叶青, 王坚刚. 微小RNA 参与调控心房颤动相关机制的研究进展[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(6): 903-905.
- [12] Jyonouchi H, Geng L, Streck D L, et al. MicroRNA expression changes in association with changes in interleukin-1 β /interleukin10 ratios produced by monocytes in autism spectrum disorders; their association with neuropsychiatric symptoms and comorbid conditions (observational study) [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 229.
- [13] Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1570-3.
- [14] Ho PC, Chang KC, Chuang YS, et al. Cholesterol regulation of receptor-interacting protein 140 via microRNA-33 in inflammatory cytokine production[J]. *FASEB J*, 2011, 25(5): 1758-1766.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 1200 页)

- [2] Zhang K, Zhang Y, Feng W, et al. Interleukin-18 enhances vascular calcification and osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through Trpm7 activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(10): 1933-1943.
- [3] Jung IH, Choi JH, Jin J, et al. CD137-inducing factors from T cells and macrophages accelerate the destabilization of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic mice [J]. *FASEB J*, 2014, 28(11): 4779-4791.
- [4] Olofsson PS, Söderström LA, Wågsäter D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*, 2008, 117(10): 1292-1301.
- [5] Jeon HJ, Choi JH, Jung IH, et al. CD137 (4-1BB) deficiency reduces atherosclerosis in hyperlipidemic mice [J]. *Circulation*, 2010, 121(9): 1124-1133.
- [6] 陈瑶, 严金川, 翁嘉懿, 等. CD137-CD137L 信号通路对小鼠动脉粥样斑块及血管平滑肌细胞钙化的影响 [J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(10): 879-884.
- [7] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [8] Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion [J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1312-1323.
- [9] Xu JF, Yang GH, Pan XH, et al. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114627.
- [10] 王中群, 戴俏武, 邵晨. 血管钙化的骨调控机制新进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(1): 78-80.
- [11] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease [J]. *Circulation*, 2008, 117(22): 2938-2948.
- [12] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J, et al. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications [J]. *Circ Res*, 2006, 99(10): 1044-1059.
- [13] Zhang C, Zhang K, Huang F, et al. Exosomes, the message transporters in vascular calcification [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(9): 4024-4033.
- [14] Zhong W, Li B, Yang P, et al. CD137-CD137L interaction modulates neointima formation and the phenotype transformation of vascular smooth muscle cells via NFATc1 signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 439(1-2): 65-74.
- (此文编辑 曾学清)