

基于NF- κ B 信号通路探讨氯化镧抑制高磷致血管平滑肌细胞钙化的机制^Δ

谷超^{1*},赵璐璐¹,李刚¹,高原¹,王胜男¹,李晓佳¹,元晓荣¹,王琪雯¹,包勒朝鲁²,韩瑞兰^{1#}(1.内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110;2.内蒙古医科大学蒙医药协同创新中心,呼和浩特 010110)

中图分类号 R692.5;R589.5;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)20-2458-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.20.05



摘要 目的:探讨氯化镧对高磷致血管平滑肌细胞(VSMCs)钙化的抑制作用及其机制。方法:在MTT法筛选氯化镧作用浓度及时间的基础上,将人VSMCs分为对照组(1 mmol/L 磷溶液)、氯化镧高浓度对照组(1 mmol/L 磷溶液+60 μ mol/L 氯化镧)、模型组(3 mmol/L 磷溶液)、氯化钠组(3 mmol/L 磷溶液+180 μ mol/L 氯化钠)、核因子 κ B(NF- κ B)信号通路激动剂+氯化镧组(3 mmol/L 磷溶液+1 μ g/mL 脂多糖+60 μ mol/L 氯化镧)、阳性对照组(3 mmol/L 磷溶液+100 μ mol/L 焦磷酸钠)和氯化镧低、中、高浓度组(3 mmol/L 磷溶液+15、30、60 μ mol/L 氯化镧),采用茜素红S染色法和 Von Kossa 染色法检测经磷溶液作用6 d、相应药物作用2 d后各组细胞的钙化情况,采用 Western blot 法检测细胞中肿瘤坏死因子受体相关蛋白6(TRAF6)、核因子 κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、NF- κ B p65、骨形态发生蛋白2(BMP-2)、平滑肌22 α (SM22 α)、Runt 相关转录因子2(Runx2)蛋白的表达水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测细胞中 TRAF6、I κ B α 、BMP-2、SM22 α 、Runx2 mRNA 的表达水平。结果:与对照组比较,氯化镧高浓度对照组细胞没有出现钙化,模型组和氯化钠组细胞均出现明显钙化且光密度(OD)值均显著升高($P<0.01$),细胞质中 TRAF6、BMP-2 蛋白及其 mRNA 的表达水平和 Runx2 mRNA 的表达水平以及细胞核中 NF- κ B p65、Runx2 蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$),细胞质中 I κ B α 、SM22 α 蛋白及其 mRNA 的表达水平和 NF- κ B p65 蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,氯化镧各浓度组和阳性对照组的钙化均明显改善,OD 值均显著降低,上述蛋白及 mRNA 的表达水平均不同程度逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与氯化镧高浓度组比较,NF- κ B 信号通路激动剂+氯化镧组细胞出现明显钙化,OD 值显著升高,细胞质以及细胞核中上述指标均显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:氯化镧可抑制高磷诱导的 VSMCs 钙化,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路活化有关。

关键词 氯化镧;高磷;血管钙化;核因子 κ B 信号通路;人血管平滑肌细胞

327.

[20] 陈谱,阮安民,周俊,等.基于NF- κ B 信号通路探讨芍药苷对LPS诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制[J].北京中医药大学学报,2020,43(11):903-909.

[21] 倪小平,马大正,雷丽红.消癥汤治疗子宫肌瘤患者130例临床观察[J].中医杂志,2012,53(7):588-590.

[22] 杜鹏辉,丁虹.米非司酮腹腔内给药对子宫肌瘤模型大鼠的干预作用[J].医药导报,2007,26(12):1401-1405.

[23] 蒋秋燕,冯春泉,唐玉云,等.消癥煎膏直肠给药对大鼠子宫肌瘤细胞凋亡的研究[J].广西中医学院学报,2008,11(2):4-6.

[24] 李玲,叶伟成.瘤净片对雌孕激素造模大鼠内分泌-免疫调节作用的研究[J].上海第二医科大学学报,2001,21(4):320-322.

[25] 范晶晶.小鼠子宫平滑肌细胞的分离培养及鉴定[J].潍坊学院学报,2012,12(4):64-66.

[26] 张丽君,贺银燕,徐谦,等.含消癥丸大鼠血清对体外培养人子宫肌瘤细胞增殖、凋亡作用的研究[J].中国中医药信息杂志,2005(8):27-28.

[27] 刘娟,许海波,向天新,等.HMGB1在急性肝衰竭大鼠中的表达及作用[J/OL].中国肝脏病杂志(电子版),2014(4):57-62[2020-05-28]. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/zggzbzz2014040024>. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2014.04.016.

[28] GAO W, HU Y, ZHANG Z, et al. Knockdown of EIF3C promotes human U-2OS cells apoptosis through increased CASP3/7 and Chk1/2 by upregulating SAPK/JNK[J]. Onco Targets Ther, 2019(12):1225-1235.

[29] 赵毅,王强,赵滢,等.胃肠道间质瘤PI3K-Akt信号转导通路介导的细胞凋亡相关因子的检测及其意义[J].现代肿瘤医学,2010,18(8):1590-1595.

[30] 武超.黄芪皂苷II通过调控HMGB1-PI3K/AKT/mTOR-溶酶体功能增加顺铂诱导的人肝癌细胞凋亡[D].合肥:安徽医科大学,2016.

[31] 刘桂云,滕学芹,于辉. HMGB1、NF- κ B p65、MMP2在子宫内膜腺癌组织中的表达及相关性研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2014,23(6):538-543.

^Δ 基金项目:内蒙古自治区科技重大专项课题(No.zdxx201805)
* 硕士研究生。研究方向:药理学。E-mail:1264524137@qq.com
通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中蒙药药理学。
E-mail:980144634@qq.com

(收稿日期:2021-04-20 修回日期:2021-08-25)
(编辑:邹丽娟)

Discussion on the Inhibitory Mechanism of Lanthanum Chloride on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Induced by High Phosphorus Based on NF- κ B Signaling Pathway

GU Chao¹, ZHAO Lulu¹, LI Gang¹, GAO Yuan¹, WANG Shengnan¹, LI Xiaojia¹, YUAN Xiaorong¹, WANG Qiwen¹, Baolechaolu², HAN Ruilan¹ (1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Collaborative Innovation Center of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To discuss the inhibitory effect of lanthanum chloride on the calcification of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by high phosphorus and its mechanism. **METHODS:** On the basis of screening the action concentration and time of lanthanum chloride by MTT method, human VSMCs were divided into control group (1 mmol/L phosphorus solution), lanthanum chloride high concentration control group (1 mmol/L phosphorus solution+60 μ mol/L lanthanum chloride), model group (3 mmol/L phosphorus solution), sodium chloride group (3 mmol/L phosphorus solution+180 μ mol/L sodium chloride), nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway agonist+lanthanum chloride group (3 mmol/L phosphorus solution+1 μ g/mL lipopolysaccharide+60 μ mol/L lanthanum chloride), positive control group (3 mmol/L phosphorus solution+100 μ mol/L sodium pyrophosphate), and lanthanum chloride low, medium, and high concentration groups (3 mmol/L phosphorus solution+15, 30, 60 μ mol/L lanthanum chloride). Alizarin red S staining and Von Kossa staining were used to detect cell calcification in each group after treated with phosphorus solution for 6 d and relevant medicine for 2 d. Western blot assay was used to detect the protein expression of TNF- α receptor associated protein 6 (TRAF6), nuclear factor κ B inhibitor protein α (I κ B α), NF- κ B p65, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), smooth muscle 22 α (SM22 α) and Runt related transcription factor 2 (Runx2). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect mRNA expression of TRAF6, I κ B α , BMP-2, SM22 α and Runx2. **RESULTS:** Compared with control group, no cell calcification was observed in the lanthanum chloride high concentration control group, while obvious cell calcification and significant increase of OD value were observed in model group and sodium chloride group ($P < 0.01$); protein and mRNA expression of TRAF6 and BMP-2 in cytoplasm as well as mRNA expression of Runx2, protein expression of NF- κ B p65 and Runx2 in nucleus were significantly increased ($P < 0.01$); protein and mRNA expression of I κ B α and SM22 α as well as protein expression of NF- κ B p65 in cytoplasm were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, cell calcification was significantly improved in lanthanum chloride groups and positive control group, while OD values were significantly reduced; the expression levels of the above-mentioned protein and mRNA were reversed to varying degrees ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with lanthanum chloride high concentration group, obvious cell calcification was observed in NF- κ B signaling pathway agonist + lanthanum chloride group, and OD value was significantly increased; the above indexes were significantly reversed in cytoplasm and nucleus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Lanthanum chloride can inhibit the calcification of VSMCs induced by high phosphorus, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway activation.

KEYWORDS Lanthanum chloride; High phosphorus; Vascular calcification; NF- κ B signaling pathway; Human vascular smooth muscle cells

全球疾病负担报告显示,2017年慢性肾脏病(CKD)的患病人数约为6.975亿,其中120万人死于肾衰竭,另有140万人死于并发症的心血管疾病^[1]。已有研究表明,随着肾功能损伤进展到晚期、功能性肾单位量减少、磷酸盐排泄受阻,再加上持续摄入饮食,CKD患者血清磷酸盐浓度将持续升高,最终可能引起血管钙化等并发症的发生,从而导致CKD患者过早死亡^[2]。

血管中层钙化是导致CKD患者心血管疾病死亡的关键因素^[3]。在高磷条件下,血管平滑肌细胞(VSMCs)能够向成骨样细胞转分化,转分化后的VSMCs可促进钙和磷酸盐沉淀以及磷酸钙晶体生长,进而促进动脉中层钙化^[4]。有研究表明,细胞外聚积的磷酸盐能通过激活核因子 κ B(NF- κ B)信号通路而诱导VSMCs向成骨样

细胞转分化,提示这一信号通路可作为抑制血管中层钙化的潜在靶标^[5-7]。

本课题组前期已经证明,氢氧化镧可改善CKD高磷血症模型大鼠的肾功能,降低其血清磷含量^[8]。除此之外,还发现纳米氢氧化镧与碳酸镧相比具有更高的效价^[9]。由于氢氧化镧难溶于水,不适宜用于细胞实验,因此本研究以氯化镧作为研究对象,基于NF- κ B信号通路探究其对高磷致VSMCs钙化的影响,旨在为CKD并发症——血管钙化的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括PikoReal 96型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪、Heraeus HERAcell 150i型CO₂

培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),DMi8 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),SpectraMax i3x 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司],AG-245 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),3-18K 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),UPHW- II -90T 型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司),PowerPac HV Power Supply 型基础电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],Odyssey CLX 型红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

氯化镧对照品(批号 298182,纯度 99.9%)、脂多糖(LPS)对照品(NF- κ B 信号通路激动剂,批号 L4391,纯度 99%)、焦磷酸钠(PPI)对照品(阳性对照,批号 S6422,纯度 99.0%~103.0%)均购自德国 Sigma 公司;氯化钠(批号 10019308,纯度 99.8%)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钠(批号 130310,分析纯)购自无锡市晶科化工有限公司;磷酸氢二钠(批号 170925,分析纯)购自上海展云化工有限公司;盐酸(批号 20140902,分析纯)购自天津市风船化学试剂科技有限公司;高糖 DMEM 培养基(批号 11995-065)、胎牛血清(批号 10099-141)均购自美国 Gibco 公司;0.25%胰酶(批号 CR2011092)、青霉素-链霉素双抗(批号 CR2011115)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量分析试剂盒(批号 P0012)、RIPA 裂解液(批号 P0013B)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(批号 C1006)均购自上海碧云天生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒(批号 DP419)购自天根生化科技(北京)有限公司;ReverTra Ace qPCR RT Kit(批号 FSQ-101)、SYBR Green Realtime PCR Master Mix(批号 QPK-201)均购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;茜素红 S 染色液(批号 G1452)、Von Kossa 染色试剂盒(批号 G3282)、兔源 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号 K101527P)均购自北京索莱宝科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)(批号 PM5090-10)购自北京酷来博科技有限公司;细胞核和细胞质提取试剂盒(批号 78833)购自赛默飞世尔科技有限公司;5 $\times$ loading buffer(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)蛋白上样缓冲液(批号 103025)购自北京普莱利基因技术有限公司;兔源肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TRAF6)单克隆抗体(批号 ab40675)、兔源核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)单克隆抗体(批号 ab32518)均购自英国 Abcam 公司;小鼠源 NF- κ B p65 单克隆抗体(批号 6956)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;小鼠源骨形态发生蛋白 2(BMP-2)单克隆抗体(批号 SC-137087)、小鼠源平滑肌 22 α (SM22 α)单克隆抗体(批号 SC-53932)、小鼠源 Runt 相关转录因子 2(Runx2)单克隆抗体(批号 SC-101145)均购自北京安诺伦生物科技有限公司;远红外 DyLight 800 荧光标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G

(IgG)(H+L)二抗(批号 A23910)、远红外 DyLight 800 荧光标记的山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(批号 A23920)均购自美国 Abbkine 公司;兔源核纤层蛋白 A/C(lamin A/C)多克隆抗体(批号 10298-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为双蒸水。

1.3 细胞

人 VSMCs 细胞株购自上海钰博生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将 VSMCs 用含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基(以下简称“完全培养基”)培养于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中(培养条件下同),待细胞生长至融合后,将传代第 5~7 代细胞用于实验。

2.2 磷溶液的制备

称取磷酸二氢钠 1.56 g,以水溶解并定容至 50 mL,作为 a 溶液。另称取磷酸氢二钠 3.58 g,以水溶解并定容至 50 mL,作为 b 溶液。取 a 溶液 9.5 mL 和 b 溶液 40.5 mL,混合,以盐酸调节 pH 至 7.4,高压灭菌 30 min,过 0.22 μ m 滤膜后,分装,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 氯化镧作用浓度及时间的筛选

采用 MTT 法进行筛选。取对数生长期细胞,用 PBS (pH 7.2~7.4,下同)洗涤后,以完全培养基 2 mL 重悬,调整细胞密度为 1×10^4 mL⁻¹,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,将细胞分为对照组(1 mmol/L 磷溶液)和不同浓度氯化镧组(3 mmol/L 磷溶液+0、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 μ mol/L 氯化镧),每组设置 4 个复孔。对照组和各氯化镧组加入相应磷溶液,持续培养 6 d 诱导钙化,分别于第 4、5、6 天时加入相应浓度氯化镧溶液(以水为溶剂),继续培养。于第 7 天时,弃去各孔培养基,加入新鲜完全培养基,再加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h;弃去培养基,加入二甲基亚砜 150 μ L,轻轻振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度(A),按如下公式计算细胞的存活率:存活率(%)=氯化镧组 A 值/对照组 A 值 $\times$ 100%。选择细胞存活率较高组别对应的浓度和时间作为后续实验氯化镧的作用浓度和时间。实验重复 3 次。

2.4 分组、造模与给药

取对数生长期细胞,用 PBS 洗涤后,以完全培养基 2 mL 重悬,调整细胞密度为 1×10^4 mL⁻¹,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,将细胞分为对照组(1 mmol/L 磷溶液)、氯化镧高浓度对照组(1 mmol/L 磷溶液+60 μ mol/L 氯化镧,氯化镧浓度参考“2.3”项下结果设置,下同)、模型组(3 mmol/L 磷溶液)、氯化钠组(3 mmol/L 磷溶液+180 μ mol/L 氯化钠,氯化钠浓度根据人

体生理钠浓度0.9%换算而得)、NF-κB 信号通路激动剂+氯化镧组(3 mmol/L 磷溶液+1 μg/mL LPS^[10]+60 μmol/L 氯化镧)、阳性对照组(3 mmol/L 磷溶液+100 μmol/L PPI^[11-12])和氯化镧低、中、高浓度组(3 mmol/L 磷溶液+15、30、60 μmol/L 氯化镧),每组设置3个复孔。各组用相应浓度的含磷完全培养基培养6 d诱导钙化,并于第5天时加入相应药物,继续培养2 d(作用时间参考“2.3”项下结果设置)。

2.5 VSMCs钙化情况的检测

2.5.1 茜素红S染色 各组细胞用PBS洗涤后,加入4%多聚甲醛溶液2 mL,在37℃下固定30 min,弃去多聚甲醛溶液,用PBS洗涤细胞,然后加入1%茜素红S染色液(pH 4.2)1 mL,在37℃下染色5 min,弃去茜素红S染色液,用PBS洗涤细胞5次,在倒置荧光显微镜下观察(钙沉积阳性细胞呈红色)。然后使用10%乙酸溶液对钙沉淀物进行脱色,使用多功能酶标仪在420 nm波长处测定各孔的光密度(OD)。

2.5.2 Von Kossa染色 各组细胞用PBS洗涤后,加入4%多聚甲醛溶液2 mL,在37℃下固定30 min,弃去多聚甲醛溶液,用PBS洗涤细胞3次后,按Von Kossa染色试剂盒说明书方法操作,在倒置荧光显微镜下观察(钙沉积物呈黑色)。

2.6 氯化镧对细胞中 TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α、Runx2蛋白表达的影响

采用Western blot法进行检测。收集各组细胞,置于1.5 mL EP管中,加入RIPA裂解液,冰上裂解5 min,于4℃下以12 000 r/min离心10 min,收集上清液,采用BCA蛋白定量分析试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白煮沸变性,取变性后蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,以5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入相应一抗(TRAF6的稀释比例为1:5 000,IκBα的稀释比例为1:1 000,NF-κB p65的稀释比例为1:500,BMP-2、SM22α、Runx2的稀释比例均为1:600,β-actin、lamin A/C的稀释比例均为1:2 000),于4℃下孵育过夜;用TBST缓冲液洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:2 000),于37℃下孵育1 h;用TBST缓冲液洗膜3次后,置于红外激光成像系统下成像。用Image J v1.8.0软件进行分析,计算TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α与内参β-actin的灰度值比值,再与对照组比较表示上述蛋白在细胞质中的表达水平;计算Runx2、NF-κB p65与内参lamin A/C的灰度值比值,再与对照组比较表示上述蛋白在细胞核中的表达水平。实验重复3次。

2.7 氯化镧对细胞中 TRAF6、IκBα、BMP-2、SM22α、Runx2 mRNA表达的影响

采用实时荧光定量PCR法进行检测。收集各组细胞,按相应试剂盒说明书方法操作,提取总RNA并将其逆转录为cDNA。以cDNA为模板,进行PCR扩增。反

应体系(共20 μL)如下:cDNA模板2 μL,上、下游引物各0.8 μL,SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL,无RNase水6.4 μL。PCR反应条件如下:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火10 s,72℃延伸15 s,共40个循环。以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算细胞中TRAF6、IκBα、BMP-2、SM22α、Runx2 mRNA的表达水平。本实验所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成,引物序列及产物长度见表1。

表1 TRAF6等基因的引物序列及产物长度
Tab 1 Primer sequence and product fragment length of TRAF6 and other genes

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
GAPDH	上游:GAAGACGGGCGGAGAGAAAC	159
	下游:GCCCAATACGACCAATCCGT	
TRAF6	上游:TACTCATCAGAGAACAGATGCC	135
	下游:TGTTCTCTTGATGTTGGCGT	
IκBα	上游:GGGCTATTCTCCCTACCAGC	174
	下游:TCATCATAGGGCAGCTCGTC	
BMP-2	上游:CCACAGCGTGAAAGAGAGAG	133
	下游:CGTCCATTGAAAGAGCGT	
SM22α	上游:AAGCCTTCTTTCCCGACACA	129
	下游:TGCACATATGATCCACTCCACC	
Runx2	上游:GAGTGGACGAGGCAAGAGTT	195
	下游:GGATGAGGAATGCGCCCTAA	

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0和Graphpad Prism 7.0软件对数据进行统计分析并作图。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LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 氯化镧的作用浓度及时间

随着氯化镧浓度的升高,钙化VSMCs的存活率先增加后降低的趋势。作用1 d时,钙化VSMCs的存活率在氯化镧浓度为15 μmol/L时达到峰值[(155.71 ± 2.02)%];作用2 d时,钙化VSMCs的存活率在氯化镧浓度为30 μmol/L时达到峰值[(194.23 ± 17.05)%];作用3 d时,钙化VSMCs的存活率在氯化镧浓度为35 μmol/L时达到峰值[(144.00 ± 11.09)%]。结果见图1。本课题组最终确定后续实验中氯化镧的低、中、高浓度分别为15、30、60 μmol/L,作用时间为2 d。

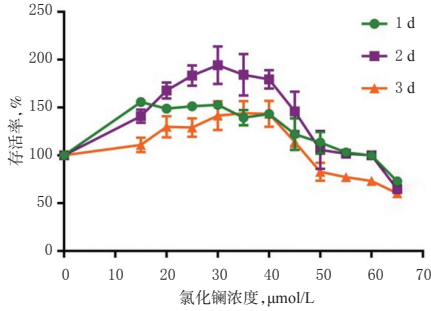


图1 不同浓度氯化镧作用不同时间对钙化VSMCs存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig 1 Effects of different concentration of lanthanum chloride for different time on the survival rate of calcified VSMCs cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.2 氯化镧对VSMCs钙化的影响

茜素红 S、Von Kossa 染色结果显示,对照组和氯化镧高浓度对照组均无红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物出现,模型组和氯化钠组则可见明显的红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物。与模型组比较,氯化镧各浓度组和阳性对照组红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物均明显减少,且氯化镧的作用有浓度依赖的趋势。氯化钠组红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物均明显多于氯化镧各浓度组。与氯化镧高浓度组比较,NF-κB 信号通路激动剂+氯化镧组红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物均明显增加。结果见图 2、图 3。

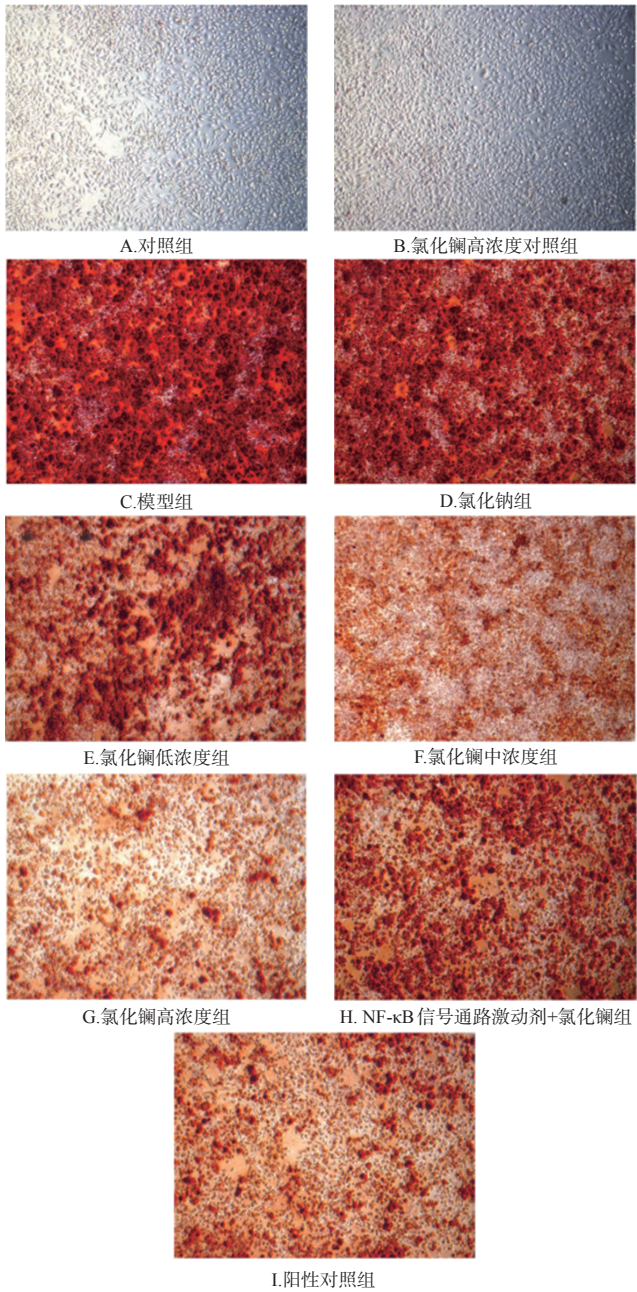


图2 各组VSMCs钙化情况的染色图(茜素红 S 染色,×50)

Fig 2 Staining diagrams of VSMCs calcification in each group (alizarin red S staining, ×50)

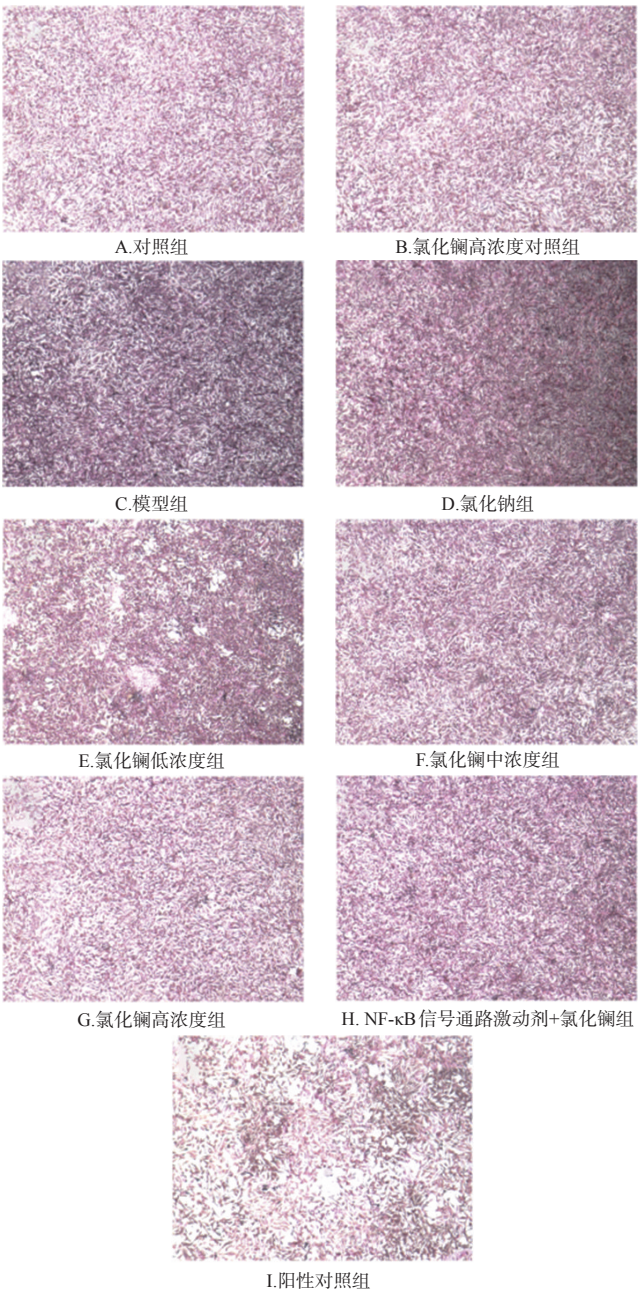


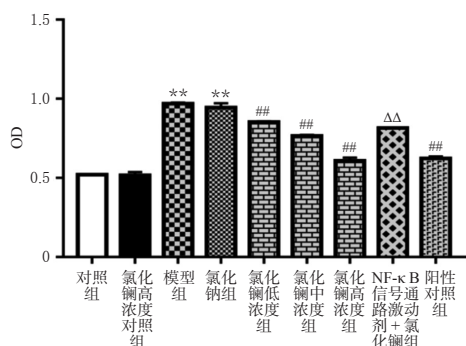
图3 各组VSMCs钙化情况的染色图(Von Kossa 染色,×50)

Fig 3 Staining diagrams of VSMCs calcification in each group(Von Kossa staining, ×50)

与对照组比较,模型组和氯化钠组细胞的OD值均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,氯化镧各浓度组和阳性对照组的OD值均显著降低($P<0.01$)。与氯化镧高浓度组比较,NF-κB 信号通路激动剂+氯化镧组细胞的OD值显著升高($P<0.01$)。结果见图 4。

3.3 氯化镧对细胞中 TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α、Runx2 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组和氯化钠组 VSMCs 细胞质中 TRAF6、BMP-2 蛋白的表达水平均显著升高,IκBα、NF-κB p65、SM22α 蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$;与氯化镧高浓度组比较, Δ $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ## $P<0.01$; vs. lanthanum chloride high concentration group, Δ $P<0.01$

图4 氯化镧对VSMCs钙化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 4 Effects of lanthanum chloride on calcification of VSMCs($\bar{x} \pm s, n=3$)

模型组比较,氯化镧中、高浓度组和阳性对照组VSMCs细胞质中TRAF6、BMP-2蛋白的表达水平均显著降低, IκBα、NF-κB p65、SM22α蛋白的表达水平和氯化镧低浓度组细胞质中SM22α蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与氯化镧高浓度组比较, NF-κB信号通路激动剂+氯化镧组VSMCs细胞质中上述指标均显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图5、图6。

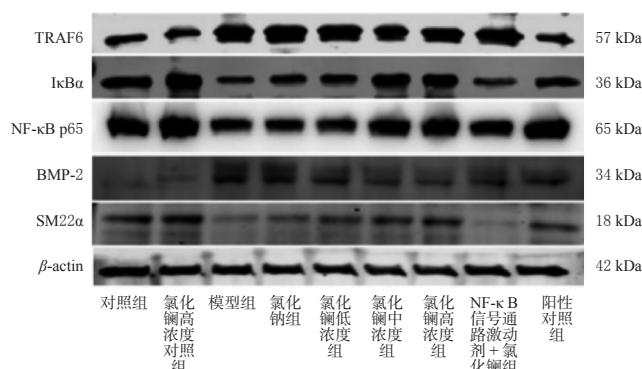


图5 氯化镧对VSMCs细胞质中TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α蛋白表达影响的电泳图

Fig 5 Electrophoretic maps of the effects of lanthanum chloride on protein expression of TRAF6, IκBα, NF-κB p65, BMP-2 and SM22α in cytoplasm of VSMCs

与对照组比较,模型组和氯化钠组VSMCs细胞核中Runx2、NF-κB p65蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,氯化镧各浓度组和阳性对照组VSMCs细胞核中Runx2、NF-κB p65(除氯化镧低、中浓度组NF-κB p65外)蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与氯化镧高浓度组比较, NF-κB信号通路激动剂+氯化镧组VSMCs细胞核中上述指标均显著逆转

($P<0.01$)。结果见图7、图8。

3.4 氯化镧对细胞中TRAF6、IκBα、BMP-2、SM22α、Runx2 mRNA表达的影响

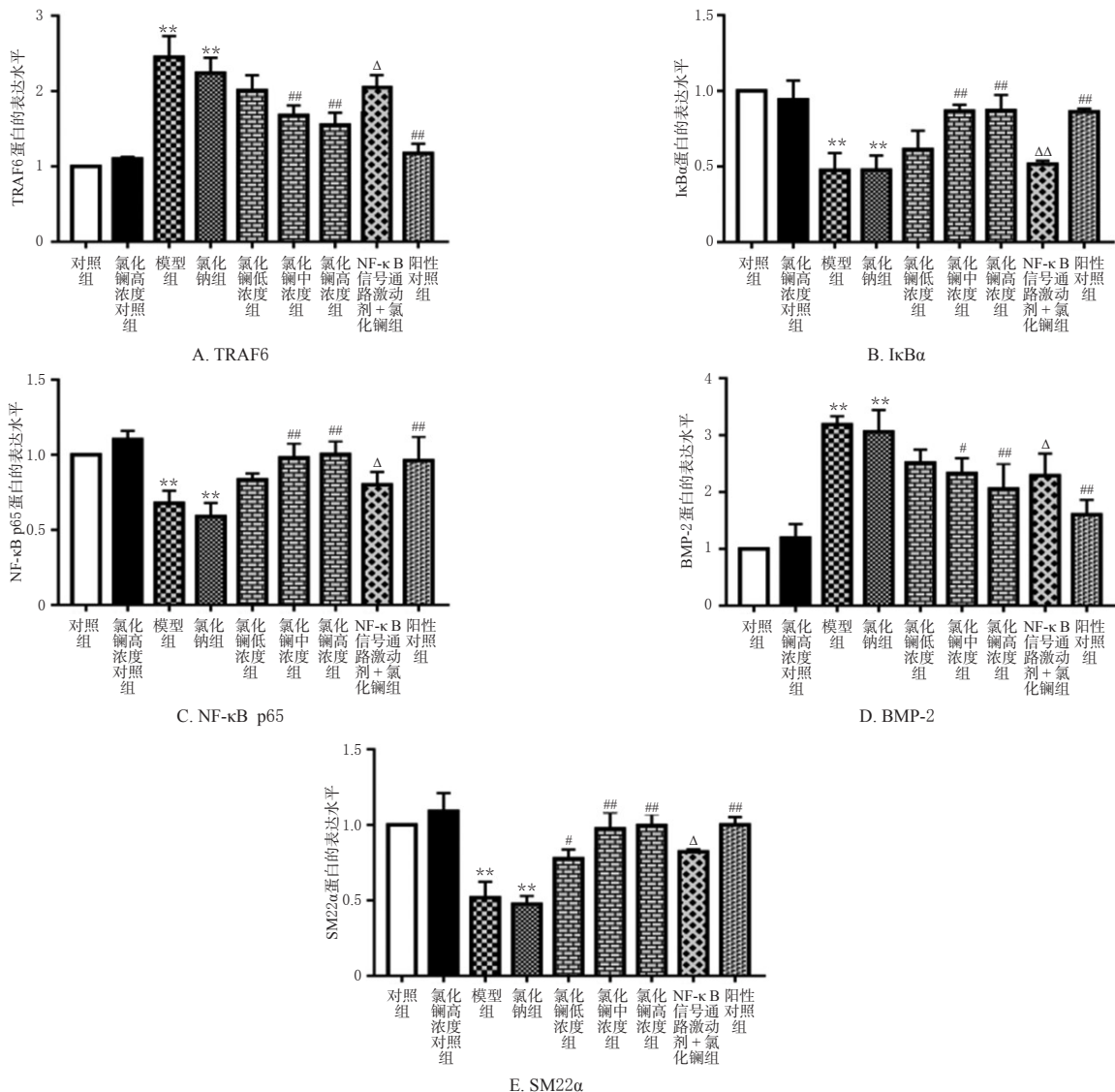
与对照组比较,模型组和氯化钠组细胞中TRAF6、BMP-2、Runx2 mRNA的表达水平均显著升高, IκBα、SM22α mRNA的表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,氯化镧各浓度组和阳性对照组细胞中TRAF6、BMP-2、Runx2 mRNA的表达水平均显著降低, IκBα(除氯化镧低浓度组外)、SM22α(除氯化镧低浓度组外) mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与氯化镧高浓度组比较, NF-κB信号通路激动剂+氯化镧组细胞中上述指标均显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图9。

4 讨论

钙在人体内大量存在,在激素分泌、递质释放、肌肉收缩、神经传导等方面均起重要作用^[13]。VSMCs向成骨样细胞转分化的过程涉及大量钙盐的生成^[14]。钙盐染色常用方法有茜素红S法^[15]和Von Kossa法(即硝酸银法)^[16]。本研究采用这两种方法检测细胞钙沉积含量,结果显示,低磷不会引起VSMCs钙化,高磷可引起VSMCs钙化,而氯化镧可抑制该钙化的发生。

本课题组前期实验使用的是氢氧化镧,但由于氢氧化镧为混悬剂,难溶于水,不适宜用于细胞实验。为此,本研究选用了可溶于水的氯化镧作为干预物,基于NF-κB信号通路探究其对高磷致VSMCs钙化的影响。另外,为了排除氯离子对实验的影响,本研究还设置了氯化钠组进行对比。结果显示,氯化镧对VSMCs钙化有明显的抑制作用且有浓度依赖的趋势,而氯化钠对VSMCs钙化并无抑制作用,由此推测发挥抑制作用的主要是镧离子,而不是氯离子。同时,为了考察单用氯化镧对VSMCs钙化的影响,本研究设置了氯化镧高浓度对照组进行对比。结果显示,氯化镧高浓度对照组无红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物出现,表明单用氯化镧对VSMCs钙化无影响。

有研究表明, VSMCs暴露于高磷条件下会诱导NF-κB的活化^[17]。NF-κB已成为VSMCs向成骨样细胞转分化的关键调节因子^[18]。NF-κB激活可增强碱性磷酸酶活性,上调BMP-2、Runx2表达,从而干扰VSMCs中的抗钙化途径^[19]。本研究根据文献[6-7, 20-22]筛选NF-κB信号通路的相关蛋白,采用Western blot法考察了氯化镧对高磷致钙化VSMCs中TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α和Runx2蛋白表达的影响。结果显示,高磷条件可使VSMCs中TRAF6游离,促进IκBα降



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与氯化镧高浓度组比较, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. lanthanum chloride high concentration group, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$

图6 氯化镧对VSMCs细胞质中TRAF6、IκBα、NF-κB p65、BMP-2、SM22α蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 6 Effects of lanthanum chloride on protein expression of TRAF6, IκBα, NF-κB p65, BMP-2 and SM22α in cytoplasm of VSMCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

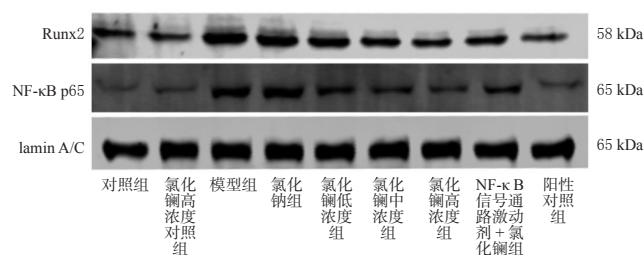
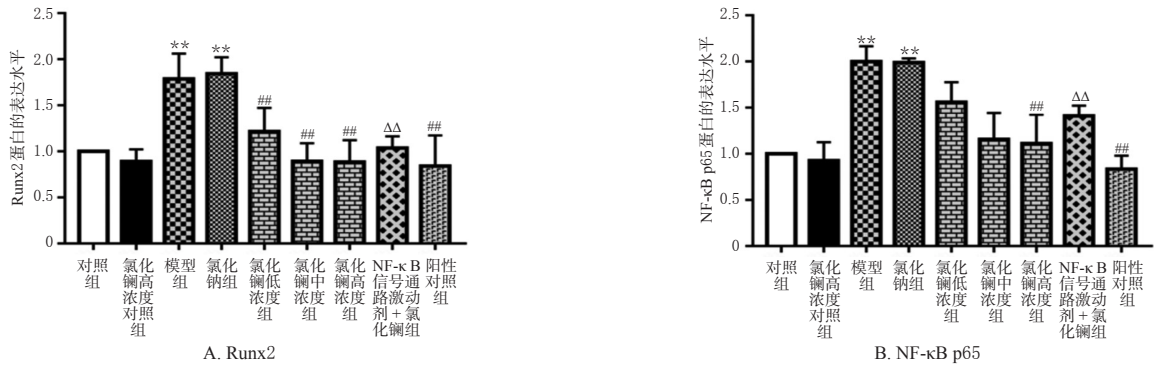


图7 氯化镧对VSMCs细胞核中Runx2、NF-κB p65蛋白表达影响的电泳图

Fig 7 Electrophoretic maps of the effects of lanthanum chloride on protein expression of Runx2 and NF-κB p65 in nucleus of VSMCs

解,随后激活NF-κB p65,活化的NF-κB p65转位至细胞核并诱导其靶因子Runx2表达,从而促进VSMCs向成

骨样细胞转分化,最终导致血管钙化。氯化镧可通过抑制钙化的VSMCs中TRAF6转录以及IκBα蛋白降解,进而抑制NF-κB入核,从而发挥抑制VSMCs钙化的作用。同时,本研究采用实时荧光定量PCR法考察了氯化镧对高磷致钙化VSMCs中TRAF6、IκBα、BMP-2、SM22α和Runx2 mRNA表达的影响,结果与蛋白表达的检测结果基本一致。为进一步验证,本研究设置了NF-κB信号通路激动剂+氯化镧组进行对比。由于尚无特异性NF-κB激动剂,故本研究参考文献[21]选用LPS作为NF-κB激动剂进行实验。结果显示,与氯化镧高浓度组比较,NF-κB信号通路激动剂+氯化镧组红色钙沉积阳性细胞和黑色钙沉积物均明显增加,表明激活NF-κB信号通路会降低氯化镧对VSMCs钙化的抑制作用。

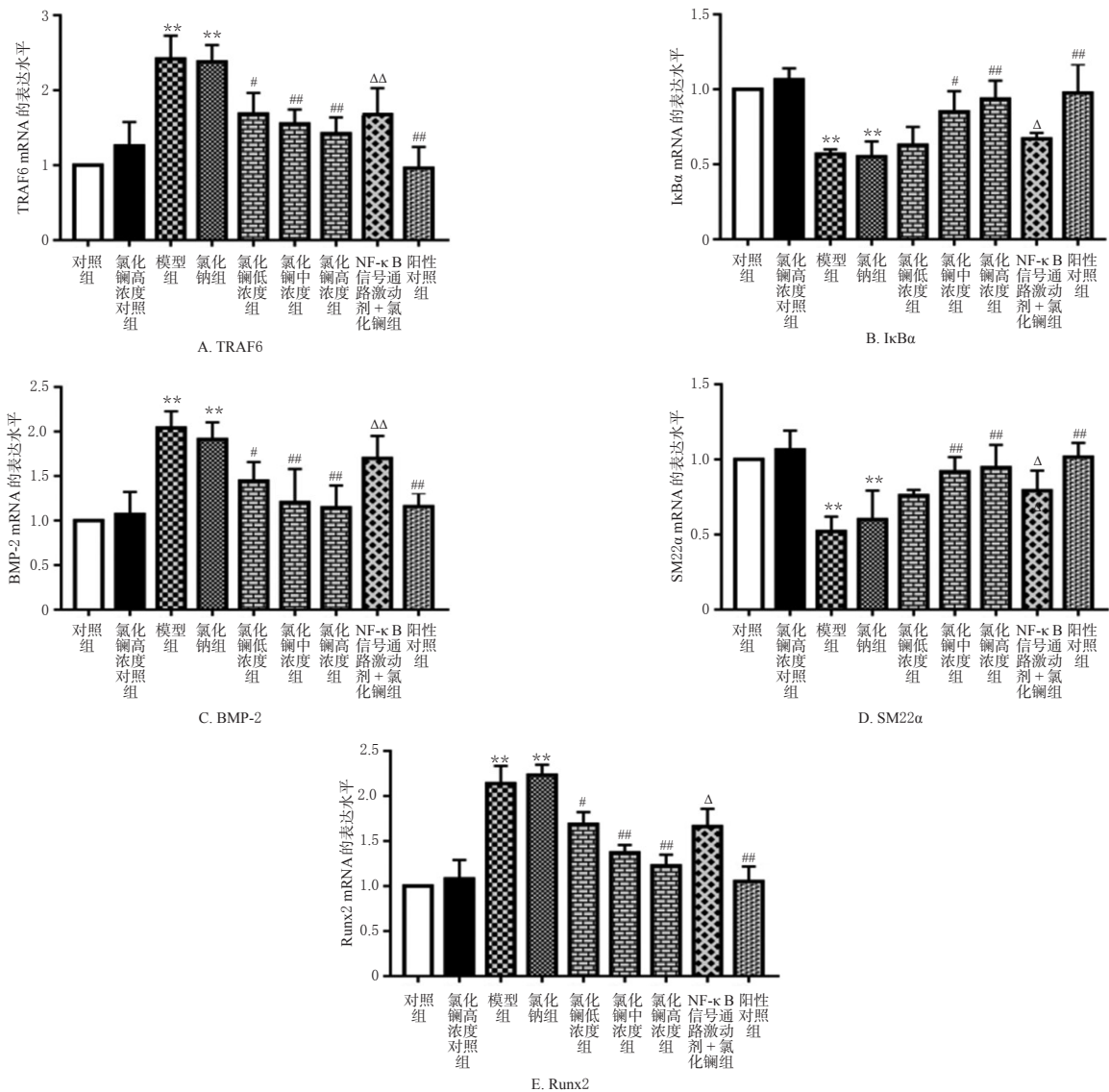


注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$;与氯化镧高浓度组比较, ^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ## $P<0.01$; vs. lanthanum chloride high concentration group, ^{ΔΔ} $P<0.01$

图8 氯化镧 VSMCs 对细胞核中 Runx2、NF-κB p65 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 8 Effects of lanthanum chloride on protein expression of Runx2 and NF-κB p65 in nucleus of VSMCs($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与氯化镧高浓度组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. lanthanum chloride high-concentration group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$

图9 氯化镧对细胞中 TRAF6、IκBα、BMP-2、SM22α、Runx2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 9 Effects of lanthanum chloride on mRNA expression of TRAF6, IκBα, BMP-2, SM22α, Runx2 and SM22α in cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

综上所述,氯化镧可抑制高磷诱导的 VSMCs 钙化,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路活化有关。

参考文献

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. Lancet, 2020, 395 (10225): 709-733.
- [2] JAMES M T, HEMMELGARN B R, TONELLI M, et al. Early recognition and prevention of chronic kidney disease[J]. Lancet, 2010, 375(9722): 1296-1309.
- [3] VOELKL J, LANG F, ECKARDT K U, et al. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(11): 2077-2091.
- [4] LEE S J, LEE I K, JEON J H, et al. Vascular calcification: new insights into its mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2685.
- [5] VOELKL J, EGLI-SPICHTIG D, ALESUTAN I, et al. Inflammation: a putative link between phosphate metabolism and cardiovascular disease[J]. Clin Sci(Lond), 2021, 135(1): 201-227.
- [6] VOELKL J, LUONG T T, TUFFAHA R, et al. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF- κ B signaling[J]. J Clin Invest, 2018, 128(7): 3024-3040.
- [7] VOELKL J, TUFFAHA R, LUONG T T D, et al. Zinc inhibits phosphate-induced vascular calcification through TNFAIP3-mediated suppression of NF- κ B[J]. Am Soc Nephrol, 2018, 29(6): 1636-1648.
- [8] 赵璐璐, 马子兴, 俞腾飞, 等. 纳米氢氧化镧对大鼠慢性肾衰竭致高磷血症的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1449-1455.
- [9] MA Z X, YU T F, WU Y, et al. Nano-lanthanum hydroxide, a novel phosphate binder, for treating hyperphosphatemia: a preclinical study[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 909-916.
- [10] 李百齐, 许伟, 李萍, 等. 不同浓度茶多酚对脂多糖诱导的内皮细胞中 NF- κ B p65 表达的影响[J]. 海南医学, 2021, 32(15): 1905-1908.
- [11] VILLA-BELLOSTA R. Synthesis of extracellular pyrophosphate increases in vascular smooth muscle cells during phosphate-induced calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(9): 2137-2147.
- [12] FAKHRY M, ROSZKOWSKA M, BRIOLAY A, et al. TNAP stimulates vascular smooth muscle cell trans-differentiation into chondrocytes through calcium deposition and BMP-2 activation: possible implication in atherosclerotic plaque stability[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(3): 643-653.
- [13] 孙慧珍, 雷水红, 龚妍春, 等. 离子通道对胰岛 β 细胞中胰岛素分泌的调控作用[J/OL]. 生命科学研究, 2021: 1-12[2021-09-26]. <http://kns.cnki.net/KXReader/Detail?TIMESTAMP=637684270564405456&dbcode=CAPJ&TABLEName=CAPJLAST&FileName=SMKY20210318001&RESULT=1&SIGN=9wPsamleX5oflpqVvoeTOAqQ8NM%3d>. DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.11.0262.
- [14] 程孝中, 黄蓓, 钟辉. 动脉钙化发生机制研究进展[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(1): 112-115.
- [15] LIU X, CHEN A, LIANG Q, et al. Spermidine inhibits vascular calcification in chronic kidney disease through modulation of SIRT1 signaling pathway[J]. Aging Cell, 2021, 20(6): e13377.
- [16] 常晓朋, 陈涛, 赵寅, 等. 骨形态发生蛋白 2 和转化生长因子 β_2 协同促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(1): 1-6.
- [17] AMANN K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2008, 3(6): 1599-1605.
- [18] ZHAO G, XU M J, ZHAO M M, et al. Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression[J]. Kidney Int, 2012, 82(1): 34-44.
- [19] 邹飏, 江川, 刘翔, 等. 氯化镧对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞作用的实验研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(26): 3480-3482.
- [20] ZHANG D, BI X, LIU Y, et al. High phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells is associated with the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(6): 1205-1215.
- [21] RAAZ U, SCHELLINGER I N, CHERNOGUBOVA E, et al. Transcription factor Runx2 promotes aortic fibrosis and stiffness in type 2 diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2015, 117(6): 513-524.
- [22] 宋晓琦, 刘玮, 刘硕, 等. LPS 触发的 TLR4 对 NF- κ B 和 IRF3 信号通路的调控差异[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(10): 1363-1367.

(收稿日期: 2021-06-15 修回日期: 2021-09-13)

(编辑: 邹丽娟)