

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.001  
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0001-05

基础研究 · 论著

## 酸性环境抑制高磷诱导大鼠 VSMCs 钙化的机制研究\*

耿同会, 徐金升, 韩迎迎, 白亚玲, 张俊霞, 崔立文, 张胜雷  
(河北医科大学第四医院 肾内科, 河北 石家庄 050011)

**摘要: 目的** 探讨酸性环境对高磷诱导的大鼠血管平滑肌细胞 (VSMCs) 钙化的影响及其机制。**方法** 体外分离培养大鼠 VSMCs, 采用免疫细胞化学法鉴定。将 VSMCs 按随机数字表法分为正常对照组、高磷 + pH 7.4 组、高磷 + pH 7.1 组。刺激 4 d 后, 采用逆转录聚合酶链反应和 Western blot 检测活化 T 细胞核因子 c1 (NFATc1)、Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 基因和蛋白的表达。刺激 14 d 后, 对各组细胞进行钙化染色、钙含量和碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定。**结果** 与正常对照组比较, 高磷 + pH 7.4 组的钙含量、ALP 活性、Runx2 和 NFATc1 表达升高 ( $P < 0.05$ ); 与高磷 + pH 7.4 组比较, 高磷 + pH 7.1 组的钙含量、ALP 活性、Runx2 和 NFATc1 表达降低 ( $P < 0.05$ )。相关性分析发现, NFATc1 蛋白表达水平与 ALP 活性、Runx2 蛋白表达水平呈正相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** 酸性环境可以抑制高磷诱导的大鼠 VSMCs 钙化, 其机制可能是通过降低 NFATc1 表达, 抑制 VSMCs 表型转化来实现的。

**关键词:** 血管钙化; 血管平滑肌细胞; 活化 T 细胞转录因子 c1; Runt 相关转录因子 2; 慢性肾衰竭

**中图分类号:** R692.5

**文献标识码:** A

## Mechanisms of acidic environment inhibiting vascular smooth muscle cell calcification induced by high phosphorus in rats\*

Tong-hui Geng, Jin-sheng Xu, Ying-ying Han, Ya-ling Bai, Jun-xia Zhang, Li-wen Cui, Sheng-lei Zhang  
(Department of Nephrology, the Forth Hospital of Hebei Medical University,  
Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect and possible mechanisms of acidification on high phosphorus-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification in rats. **Methods** VSMCs were isolated from rat aorta, and randomly divided into control group and high phosphorus group. The high phosphorus group was further settled into two subgroups, i.e. high phosphorus+pH 7.1 group and high phosphorus+pH 7.4 group, which were treated with  $\beta$ -glycerophosphate, and acidified by HCl to adjust the pH. The mRNA expressions of nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1) and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) in VSMCs were detected by RT-PCR after stimulation for 4 days. The activity of alkaline phosphatase (ALP) and calcium deposition were tested after culture for 14 days. **Results** Compared to the control group, calcium depositon and ALP activity were significantly increased in the high phosphorus+pH 7.4 group ( $P < 0.05$ ), and the expressions of NFATc1 and RUNX2 were upregulated as well ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the calcification level and the expressions of RUNX2 and NFATc1 in the high phosphorus+pH 7.1 group were lower than those in the high phosphorus+pH 7.4 group ( $P < 0.05$ ). NFATc1 expression level was positively correlated with ALP activity and RUNX2 expression level ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Acidic environment can inhibit VSMC calcification induced by high phosphorus in rats, its

收稿日期: 2016-10-10

\* 基金项目: 河北省自然科学基金 (No: H2012206157); 河北省科技计划项目 (No: 16397733D)

[通信作者] 徐金升, E-mail: xjs5766@126.com

mechanism is possibly by downregulation of *NFATc1* expression and prevention of VSMC phenotypic transformation.

**Keywords:** vascular calcification; vascular smooth muscle cell; *NFATc1*; *RUNX2*; chronic renal failure

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者心血管疾病发病率是普通人群的 10 ~ 30 倍<sup>[1]</sup>, 血管钙化为主要危险因素<sup>[2]</sup>。血管钙化是细胞介导的生物矿化过程<sup>[3]</sup>, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 表型转化是其重要机制<sup>[4]</sup>。代谢性酸中毒是 CKD 患者常见的并发症。研究发现, 酸性环境可抑制大鼠血管钙化, 但具体机制尚不明确<sup>[5]</sup>。活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 是一种有多种调控作用的转录因子, GOETTSCH 等<sup>[6]</sup>发现, *NFATc1* 对血管钙化有促进作用。因此笔者推测, 酸性环境可能通过下调 *NFATc1* 表达, 抑制血管钙化。本实验以大鼠 VSMCs 为研究对象, 旨在探讨酸性环境对高磷诱导大鼠 VSMCs 钙化的影响及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6 只 4 周龄健康雄性 SD 大鼠, 原代培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞, 大鼠购自河北医科大学实验动物中心, 动物合格证标号: 1305090。

**1.1.2 主要仪器和试剂** 倒置相差显微镜 (LH50A 型) (日本 Olympus 公司), CYTATION3 型酶标仪 (美国 Biotek 公司), 胎牛血清、细胞培养基购自美国 Gibco 公司,  $\beta$ -甘油磷酸 (美国 Sigma 公司), 酸度计 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 钙含量测定试剂盒 (北京中生北控生物科技股份有限公司), RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司), PCR 引物 (上海英潍捷基公司), *NFATc1*、*Runt* 相关转录因子 2 (*runt* related transcription factor 2, *Runx2*) 抗体购自英国 Abcam 公司, *GAPDH* 抗体 (美国 Bioworld 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 钙化 VSMCs 的制备及分组** 取 4 周龄健康雄性 SD 大鼠的胸主动脉, 采用组织块贴壁法培养原代 VSMCs, 实验取 3 ~ 5 代细胞。采用随机数字表法, 将 VSMCs 随机分为正常对照组、高磷 + pH 7.4 组、高磷 + pH 7.1 组。正常对照组用含 10% 胎牛血清培养基培养, 调整 pH 值至 7.4; 高磷 + pH 7.4 组在 10% 胎牛血清培养基中加入 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷

酸, 调整 pH 值至 7.4; 高磷 + pH 7.1 组用高磷培养基, 调整 pH 值至 7.1。使用 1 mol/L 盐酸 HCl 和 7.4% 碳酸氢钠调整培养基 pH 值, 换液 1 次 /24 h。

**1.2.2 细胞钙含量测定** 将 24 孔板内培养的细胞干预 14 d 后, 弃上清液, 用 1 mmol/L HCl 消化过夜, 取上清, 使用邻甲酚酞络合酮比色法测定钙含量; 细胞用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液和 0.1% 十二烷基硫酸钠溶解 30 min, 根据吸光度值计算细胞蛋白含量。VSMCs 的钙含量结果用细胞钙含量与蛋白含量的比值表示 (mg/g)。

**1.2.3 茜素红染色** 取 4 ~ 5 代细胞以  $5 \times 10^4$  个 / 孔密度接种于 24 孔板内, 干预 14 d。用 pH 8.4 浓度为 0.1% 的茜素红染液进行钙化染色, 倒置显微镜下观察照相。结果判断标准: 钙盐沉积为橘红色。

**1.2.4 ALP 活性测定** 将细胞培养 14 d 后弃上清, 磷酸盐缓冲溶液冲洗 2 次, 加入 1% 聚乙二醇辛基苯基醚生理盐水, 置于 4℃ 冷藏 24 h 后离心, 取上清液, 按 ALP 活性试剂盒说明书操作, 测定其活性, 结果用蛋白质校准。

**1.2.5 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)** RT-PCR 检测 VSMCs 目的基因的表达。干预 4 d 后提取各组细胞 mRNA, 测定 *NFATc1* 和 *Runx2* 基因的表达。PCR 引物由 Primer 5.0 软件设计, 引物序列见表 1。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, *NFATc1* 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 32 个循环; *GAPDH* 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 32 个循环; *Runx2* 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 28 个循环, 72℃ 继续延伸 10 min。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
<i>NFATc1</i>	正向: 5'-GTGGCAGCCATCAACGCCCT-3'	241
	反向: 5'-TACGAGGCCTGTGGCACCGA-3'	
<i>Runx2</i>	正向: 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'	289
	反向: 5'-CGCTCGGCCACAAATCTC-3'	
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-CAAGTTCATCCATGACAACTTTC-3'	496
	反向: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

**1.2.6 Western blot 检测** Western blot 检测 VSMCs 目的蛋白的表达。干预 4 d 后提取各组细胞蛋白, 测定 NFATc1 和 Runx2 蛋白的表达。细胞蛋白质用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜、封闭, 加入一抗稀释液 (NFATc1 1 : 1 000, Runx2 1 : 500, GAPDH 1 : 5 000), 4℃ 孵育过夜。洗膜, 放入二抗稀释液 (1 : 5 000), 室温下孵育 1 h, 定影显色, 分析条带灰度值。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 SNK-*q* 检验; 相关性分析用 Pearson 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 酸性环境对高磷诱导 VSMCs 钙化的影响

干预 14 d 后, 正常对照组、高磷 + pH 7.4 组、高磷 + pH 7.1 组 VSMCs 的钙含量分别为 ( $47.423 \pm 10.515$ )、( $119.306 \pm 13.443$ ) 和 ( $89.738 \pm 12.542$ ) mg/g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 22.138$ ,  $P = 0.0017$ )。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, 各组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。高磷环境下大鼠 VSMCs 钙含量水平升高; pH 值降低时 VSMCs 钙含量减少。

与钙含量结果类似, 茜素红染色可见正常对照组 VSMCs 无橘红色钙盐结节出现, 高磷组有大量橘红色钙盐沉积, 而酸干预可使钙盐沉积减少。见图 1。

### 2.2 酸性环境对高磷诱导 VSMCs 表型转化的影响

正常对照组、高磷 + pH 7.4 组、高磷 + pH 7.1 组 VSMCs 的 ALP 活性分别为 ( $32.510 \pm 2.393$ )、( $106.206 \pm 4.294$ ) 和 ( $85.715 \pm 6.227$ ) u/g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 40.909$ ,  $P = 0.000$ )。进一步两

两比较经 SNK-*q* 检验, 各组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。高磷 + pH 7.4 组 ALP 活性高于正常对照组; 酸干预后 ALP 活性降低。

正常对照组、高磷 + pH 7.1 组、高磷 + pH 7.4 组 VSMCs 的 Runx2 mRNA 相对表达量分别为 ( $0.213 \pm 0.008$ )、( $0.317 \pm 0.054$ ) 和 ( $0.562 \pm 0.070$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 36.924$ ,  $P = 0.000$ )。正常对照组、高磷 + pH 7.1 组、高磷 + pH 7.4 组 VSMCs 的 Runx2 蛋白相对表达量分别为 ( $0.390 \pm 0.108$ )、( $0.785 \pm 0.069$ ) 和 ( $1.095 \pm 0.121$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 36.408$ ,  $P = 0.000$ )。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, 正常对照组、高磷 + pH 7.1 组 Runx2 mRNA 和蛋白表达水平较高磷 + pH 7.4 组低 ( $P < 0.05$ ), 表明酸性环境可下调 Runx2 表达。见图 2。

### 2.3 酸性环境对高磷诱导的 VSMCs 中 NFATc1 表达的影响

正常对照组、高磷 + pH 7.1 组、高磷 + pH 7.4 组 VSMCs 的 NFATc1 mRNA 相对表达量分别为 ( $0.264 \pm 0.043$ )、( $0.419 \pm 0.073$ ) 和 ( $0.668 \pm 0.097$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 22.512$ ,  $P = 0.002$ )。正常对照组、高磷 + pH 7.1 组、高磷 + pH 7.4 组 VSMCs 的 NFATc1 蛋白相对表达量分别为 ( $0.155 \pm 0.066$ )、( $0.362 \pm 0.031$ ) 和 ( $0.661 \pm 0.096$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 36.408$ ,  $P = 0.000$ )。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, 正常对照组、高磷 + pH 7.1 组 NFATc1 mRNA 和蛋白表达水平较高磷 + pH 7.4 组低 ( $P < 0.05$ ), 高磷环境 NFATc1 表达升高。见图 3。

### 2.4 NFATc1 与 Runx2、ALP 的相关性

VSMCs 中 NFATc1 与 Runx2 表达呈正相关 ( $r = 0.801$ ,  $P = 0.003$ ), NFATc1 与 ALP 活性呈正相关 ( $r = 0.698$ ,  $P = 0.002$ )。

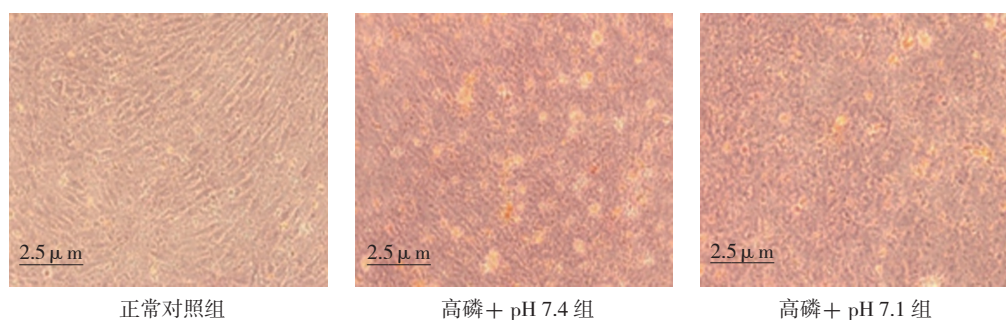
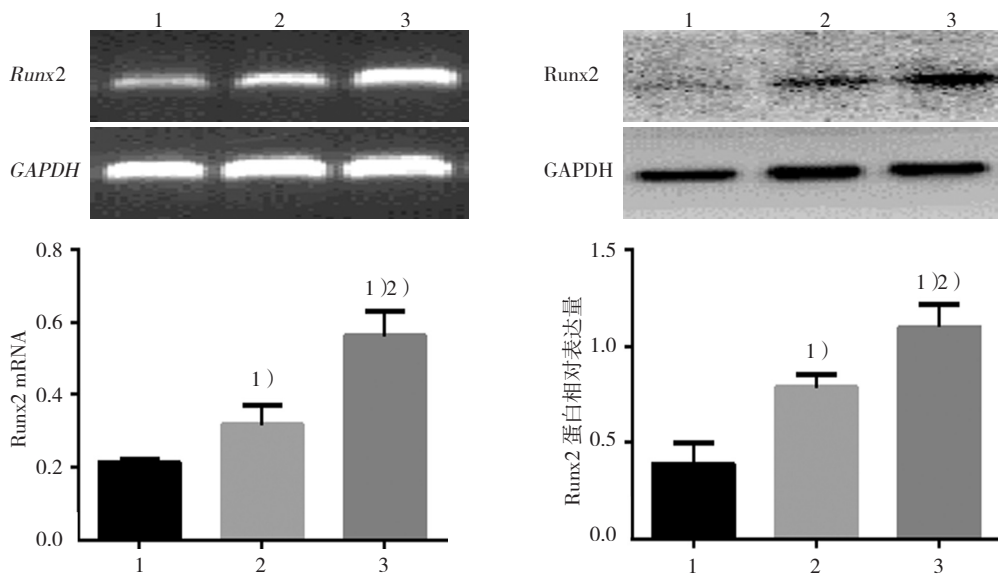
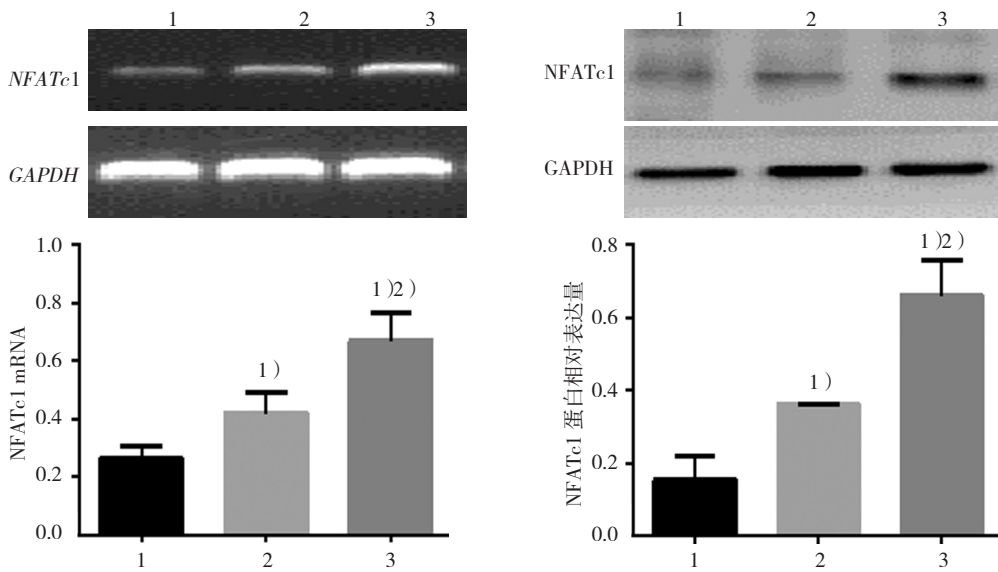


图 1 各组大鼠 VSMCs 钙盐沉积 (茜素红染色)



1: 正常对照组; 2: 高磷 + pH 7.1 组; 3: 高磷 + pH 7.4 组。1) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与高磷 + pH 7.1 组比较,  $P < 0.05$

图 2 各组大鼠 VSMCs 的 Runx2 mRNA 和蛋白的表达



1: 正常对照组; 2: 高磷 + pH 7.1 组; 3: 高磷 + pH 7.4 组。1) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与高磷 + pH 7.1 组比较,  $P < 0.05$

图 3 各组大鼠 VSMCs 的 NFATc1 mRNA 和蛋白的表达

### 3 讨论

代谢性酸中毒是 CKD 患者的常见并发症。近期研究发现,代谢性酸中毒可以抑制 VSMCs 表型转化<sup>[4]</sup>。近年来就酸性环境对骨形成的作用研究较为深入,然而其对血管钙化的作用研究甚少,仅证实 VSMCs 成骨/成软骨表型转化是其重要机制之一<sup>[7]</sup>,因此,可将酸性环境对成骨作用的影响推演到血管钙化上。血管钙化是 CKD 患者发生心血管疾病的重要危险因素,不同于普通人群发生的动脉粥样硬化,CKD 患者以血

管中膜钙化为突出表现<sup>[8]</sup>。VSMCs 作为血管中膜的重要成分,在血管钙化发生过程中起重要作用。本实验通过体外培养 VSMCs,深入探讨酸性环境对 VSMCs 钙化的影响,发现与正常对照组相比,高磷刺激加重 VSMCs 钙化,酸刺激可抑制高磷诱导的 VSMCs 钙化。

血管钙化是多因素共同参与的复杂病理过程,其发病机制尚未完全清楚。血管钙化常常伴随 Runx2 和 ALP 等成骨相关蛋白的表达<sup>[7]</sup>。Runx2 是 Runt 结构域基因家族一员,可结合成骨细胞特异性顺式作用元件,调控下游骨基质和骨胶原的产生,参与成骨细胞分

化<sup>[7]</sup>。ALP 亦是成骨细胞形成的早期标志物。两者在正常 VSMCs 中表达较低, 在钙化的血管和心脏瓣膜组织中表达升高<sup>[9]</sup>。因此, 可以凭借 VSMCs 中 Runx2 的表达量和 ALP 活性推测其是否发生成骨样表型转化。本研究结果显示, 与高磷 + pH 7.4 组相比, 高磷 + pH 7.1 组 VSMCs 的 Runx2 表达和 ALP 活性降低, 提示高酸性环境抑制 VSMCs 钙化的机制可能是抑制 VSMCs 发生成骨样表型转化。

NFAT 最初在 T 细胞中因其免疫调控作用被发现, 之后发现除免疫系统外, NFAT 转录因子在其他组织也有广泛分布, 如心肌、骨骼肌、卵巢等组织, 具有多种生理功能, 如参与刺激 T 细胞活化、成骨细胞分化和成骨作用、破骨细胞分化, 调控内皮细胞及 VSMCs 增殖<sup>[10]</sup>。NFAT 家族蛋白活性主要由  $Ca^{2+}$ /钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 调节。当  $Ca^{2+}$ 、钙调节蛋白与 CaN 结合后诱发 CaN 构象改变, 使自身抑制域移位, 暴露出活性位点, 导致 CaN 活化, 继而使细胞浆中 NFAT 脱磷酸化, 暴露其核定位信号, NFAT 得以转位入核, 与核内其他转录因子协同调节多种基因的活化<sup>[11]</sup>。研究表明, 在 VSMCs 中, NFATc1 高表达, NFATc3 少量表达, 而 NFATc2 和 NFATc4 几乎不表达<sup>[12]</sup>。有研究发现, 在氧化低密度脂蛋白诱导 VSMC 钙化过程中, NFAT 发挥重要作用, 敲除 NFAT 基因能抑制 Runx2 表达和基质矿化<sup>[6]</sup>。以上研究表明, NFATc1 在血管钙化中发挥重要作用, 因此笔者推测 NFATc1 可能参与酸抑制 VSMCs 钙化的过程。本研究从体外实验观察 VSMCs 中 NFATc1 的表达, 结果发现高磷 + pH 7.4 组 VSMCs 中 NFATc1 表达高于正常对照组, 提示 NFATc1 参与慢性肾衰竭大鼠血管钙化的发生, 可能对其有促进作用; 进一步比较发现, 酸性环境能够抑制 VSMCs 中 NFATc1 mRNA 和蛋白的表达, 由此推测 NFATc1 可能是酸抑制 VSMCs 钙化发生的因素之一。

NFATc1 在酸抑制高磷诱导的 VSMCs 钙化中如何发挥作用? 本研究就 VSMCs 中 NFATc1 蛋白表达水平与表型转化指标 (ALP 活性和 Runx2 蛋白表达水平) 做相关性分析, 结果发现 NFATc1 与 Runx2 蛋白表达、ALP 活性呈正相关。因此, 笔者推测酸抑制 VSMCs 发生钙化的可能机制是通过降低 NFATc1 表达, 抑制 VSMCs 发生表型转化来实现的。

综上所述, 本研究通过体外研究发现, 酸性环境可以抑制高磷诱导的大鼠 VSMCs 钙化, 其可能机制是通过降低 NFATc1 表达, 抑制 VSMCs 发生表型转化来实现的。但本研究仅从实验室内观察到 NFATc1 在酸抑制血管钙化中的作用, 具体机制仍需进一步实验研究, 以期临床预防和治疗 CKD 患者的血管钙化提供新靶点。

#### 参 考 文 献:

- [1] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. *Lancet*, 2013, 382(9888): 260-272.
- [2] 白亚玲, 徐金升, 武娇, 等. 慢性肾脏病大鼠血管收缩张力与血管钙化的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(11): 19-23.
- [3] LIU Y, LIN F, FU Y, et al. Cortistatin inhibits calcification of vascular smooth muscle cells by depressing osteoblastic differentiation and endoplasmic reticulum stress[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(11): 2671-2681.
- [4] 管思明, 辛华平, 方欣, 等. 血管中骨髓间充质干细胞在不同钙化环境中的分化研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2014, 33: 916-919.
- [5] MENDOZA F J, LOPEZ I, MONTES de OCA A, et al. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats[J]. *Kidney Int*, 2008, 73(4): 407-414.
- [6] GOETTSCHE C, RAUNER M, HAMANN C, et al. Nuclear factor of activated T cells mediates oxidised LDL-induced calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Diabetologia*, 2011, 54: 2690-2701.
- [7] DEMER L L, TINTUT Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34: 715-723.
- [8] LANZER P, BOEHM M, SORRIBAS V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35: 1515-1525.
- [9] ZHOU S, FANG X, XIN H, et al. Osteoprotegerin inhibits calcification of vascular smooth muscle cell via down regulation of the Notch1-RBP-Jkappa/Msx2 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): DOI: 10.1371/journal.pone.68987.
- [10] QIN J J, NAG S, WANG W, et al. NFAT as cancer target: mission possible[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846: 297-311.
- [11] CHOO M K, YEO H, ZAYZAFON M. NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation[J]. *Bone*, 2009, 45: 579-589.
- [12] WADA H, HASEGAWA K, MORIMOTO T, et al. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription[J]. *J Cell Biol*, 2002, 156: 983-991.

(童颖丹 编辑)