

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.16.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 16-0036-07

实验研究·论著

DNA损伤应答通路在高钙磷环境诱导的人主动脉血管平滑肌细胞钙化中的作用*

范志娟, 刘树业, 田亚琼, 刘爽

(天津市第三中心医院 检验科, 天津 300170)

摘要: **目的** 明确DNA损伤应答通路在高钙磷环境诱导的人主动脉血管平滑肌细胞(HVSMC)钙化过程中的作用。**方法** 将HVSMC培养分为对照组、模型组、共济失调毛细血管扩张突变激酶(iATM)组、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(iPARP)组, 培养12 d。茜素红-S染色法定性和邻-甲酚酞法定量检测4组细胞钙化情况, 彗星实验检测DNA损伤, Western blotting和免疫荧光方法检测组蛋白 γ H2AX磷酸化水平, 酶联免疫吸附试验检测8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG)水平, NucleoCounter NC-3000™高级细胞分析仪分析4组细胞的存活率。**结果** 光学显微镜和茜素红S染色发现第9天开始, 与对照组相比, 模型组出现细胞内钙质沉积, 第12天钙质沉积明显。对照组与模型组分别在第3、6、9、12天培养状态下 Ca^{2+} /蛋白比较, 结果: ①不同时间点 Ca^{2+} /蛋白有差异($F=168.970, P=0.000$); ②模型组与对照组 Ca^{2+} /蛋白有差异($F=203.040, P=0.000$), 模型组 Ca^{2+} /蛋白较高, 钙化明显; ③两组 Ca^{2+} /蛋白变化趋势有差异($F=13.213, P=0.000$)。培养12 d时, 茜素红S染色发现模型组比对照组钙化程度高, iATM组和iPARP组比模型组钙化程度低。 σ -甲酚酞试验发现, iATM组和iPARP组 Ca^{2+} /蛋白低于模型组($P<0.05$)。彗星试验发现, 对照组比较, 模型组第9天开始出现更多数量的DNA受损细胞。对照组与模型组分别在第3、6、9、12天培养状态下“彗星细胞”比较, 结果: ①不同时间点“彗星细胞”有差异($F=13.141, P=0.000$); ②模型组与对照组“彗星细胞”有差异($F=121.521, P=0.000$), 模型组“彗星细胞”百分比较高, DNA损伤明显; ③模型组与对照组“彗星细胞”变化趋势有差异($F=89.290, P=0.000$)。模型组 γ H2AX蛋白相对表达量高于对照组($P<0.05$)。对照组、模型组分别在第3和12天免疫荧光显微镜下观察>3个 γ H2AX病灶百分比, 结果: ①不同时间点>3个 γ H2AX病灶百分比有差异($F=168.970, P=0.000$); ②模型组与对照组>3个 γ H2AX病灶百分比有差异($F=203.040, P=0.000$), 模型组>3个 γ H2AX病灶百分比较高, DNA损伤明显; ③模型组与对照组>3个 γ H2AX病灶百分比变化趋势有差异($F=153.410, P=0.000$)。模型组8-OHdG水平高于对照组($P<0.05$)。模型组细胞存活率低于对照组、iATM组、iPARP组($P<0.05$); iATM组、iPARP组与对照组细胞存活率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 高 Ca^{2+} /P环境激活DNA损伤应答信号通路, 诱导HVSMC坏死, 进而形成钙化。

关键词: DNA损伤应答; 钙磷失衡; 人主动脉血管平滑肌细胞; 钙化

中图分类号: R543.1

文献标识码: A

The role of DNA damage response pathway in HVSMC calcification induced by high calcium and phosphorus*

Fan Zhi-juan, Liu Shu-ye, Tian Ya-qiong, Liu Shuang

(Department of Laboratory, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin, 300170, China)

Abstract: Objective To determine the role of the DNA damage response (DDR) pathway in calcification of human vascular smooth muscle cell (HVSMC) induced by high calcium and phosphorus. **Methods** HVSMCs were

收稿日期: 2022-11-14

* 基金项目: 天津市自然科学基金(No:19JCYBJC11240); 天津市卫生健康委科技基金(No:KJ20151)

[通信作者] 刘树业, E-mail: lshye@163.com; Tel: 15522242777

divided into the control group, model group, ataxia-telangiectasia mutated inhibitor (iATM) group, and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor (iPARP) group, and were cultured for 12 days. Qualitative and quantitative analyses of HVSMC calcification in the four groups were performed via Alizarin red S staining and o-Cresolphthalein chromogenic method, respectively. The DNA damage was measured via the comet assay. The phosphorylation level of histone γ H2AX was detected by Western blotting and immunofluorescence, while the level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHDG) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Besides, the cell viability of the four groups was analyzed by Nucleo Counter® NC-3000™ Advanced Cell Analyzer. **Results** From the 9th day on, intracellular calcium deposition as shown under the light microscope and by the Alizarin red S staining occurred in the model group in comparison to the control group, and the calcium deposition was obvious on the 12th day. The ratio of the level of calcium to that of proteins on the 3rd, 6th, 9th, and 12th day was compared between the control group and the model group, which suggested that the ratio of the level of calcium to that of proteins was different among the time points ($F = 168.970$, $P = 0.000$) and between the groups ($F = 203.040$, $P = 0.000$), where the ratio of the level of calcium to that of proteins and the degree of calcification were greater in the model group. In addition, the change trends of the ratio of the level of calcium to that of proteins was different between the two groups ($F = 13.213$, $P = 0.000$). On the 12th day of culture, the degree of calcification as shown by the Alizarin red S staining was higher in the model group than in the control group, whereas the degree of calcification in the iATM group and the iPARP group was lower than that in the model group. The calcium assay via the o-Cresolphthalein chromogenic method demonstrated that the ratio of the level of calcium to that of proteins was lower in the iATM group and the iPARP group than in the model group ($P < 0.05$). The comet assay found that there were greater numbers of cells bearing DNA damage in the model group than in the control group since the 9th day. The percentage of cells bearing DNA damage on the 3rd, 6th, 9th, and 12th day of culture was compared between the control group and the model group, and the results exhibited that the percentage of cells bearing DNA damage was different among the time points ($F = 13.141$, $P = 0.000$) and between the groups ($F = 121.521$, $P = 0.000$). Specifically, the percentage of cells bearing DNA damage was even higher in the model group. Besides, the change trends of the percentage of cells bearing DNA damage were different between the two groups ($F = 89.290$, $P = 0.000$). The relative protein expression of γ H2AX in the model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The comparison of the percentage of >3 γ H2AX-positive lesions under the fluorescence microscope on the 3rd and 12th day in the control group and the model group showed that the percentage of >3 γ H2AX-positive lesions under the fluorescence microscope was different between the time points ($F = 168.970$, $P = 0.000$) and between the groups ($F = 203.040$, $P = 0.000$), in which the percentage of >3 γ H2AX-positive lesions under the fluorescence microscope was even higher in the model group that suggested obvious DNA damage. The change trends of the percentage of >3 γ H2AX-positive lesions under the fluorescence microscope were different between the model group and the control group ($F = 153.410$, $P = 0.000$). The level of 8-OHDG in the model group was higher than that of the control group ($P < 0.05$). The cell viability in the model group was lower than that in the iATM group and the iPARP group ($P < 0.05$), while the cell viability in the control group was not different from that in the iATM group and the iPARP group ($P > 0.05$). **Conclusions** High calcium and phosphorus may activate the DNA damage response signaling pathway and induce necrosis of HVSMC which in turn causes HVSMC calcification.

Keywords: DNA damage response; imbalance of calcium and phosphorus; human vascular smooth muscle cell; calcification

心血管并发症是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 常见并发症和首要死亡原因^[1]。动脉血管钙化是 CKD 患者并发心血管疾病的主要机制^[2]。血管钙化的病理机制可能包括高钙磷水平、氧化应激、细胞死亡、炎症刺激、能量代谢障碍和自噬障碍等^[3-5]。在 CKD 患者血管钙化过程中, 高钙磷环境产生持续氧化应激, 引起 DNA 损伤。氧化应激型 DNA 损伤会随着时间的推移成为持续 DNA 损伤。

持续 DNA 损伤通过 DNA 损伤应答 (DNA damage response, DDR) 途径诱导细胞凋亡进而成为钙化灶, 并进一步诱导血管钙化^[6]。

近年来, 多项研究发现 DDR 在血管早衰病理中发挥关键作用^[6-7]。DNA 损伤应答信号通路通过启动和协调 DNA 修复机制与适当的细胞周期阻滞检查点以维持基因组稳定性^[7]。典型的 DDR 级联反应始于 DNA 损伤。其中比较常见的信号转导蛋白是

共济失调毛细血管扩张突变激酶(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)。两者在DNA损伤检测和修复中起关键作用^[8-9]。然而到目前为止,尚无研究完全阐明DDR在CKD患者血管平滑肌细胞钙化中的调控作用。

本研究拟通过高钙磷(Ca^{2+}/P)培养诱导细胞钙化,进而使用DDR抑制剂与高 Ca^{2+}/P 共培养以明确DDR抑制剂是否在CKD患者 Ca^{2+}/P 失衡导致细胞钙化的过程中发挥作用,为CKD患者并发动脉硬化及相关心血管疾病的临床治疗提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 HASMC培养

将人主动脉血管平滑肌细胞(human vascular smooth muscle cell, HVSMC)(美国Scien Cell公司)接种至M199培养基(含20% FBS + 1% PSG),置于37℃,5%二氧化碳孵箱中孵育,每1~2天换液1次,第3~8代用于本实验。当培养基中细胞处于对数生长期,生长状态良好时即可冷冻保存。离心去上清液后取0.9 mL胎牛血清重悬细胞沉淀,加入10% FBS二甲基亚砷混匀,封入冻存管,放到含异丙醇的防冻容器中,之后-80℃冷冻机中逐渐冷冻。24 h后,将冷冻的细胞转移至液氮中。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 TCS SP5激光共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司),Odyssey 双色红外激光成像系统(美国LICOR公司)、NucleoCounter[®] NC-3000™高级细胞分析仪(丹麦ChemoMetec公司)。

1.2.2 主要试剂 M199培养基(美国Thermo Fisher公司)、KU55933(ATM抑制剂,10 μmol,美国Abcam公司),PJ34(PARP抑制剂,10 μmol,美国Abcam公司),茜素红S染色液(上海碧云天生物技术有限公司)、钙离子定量检测试剂盒(邻-甲酚酞法)、磷酸化组蛋白H2AX抗体(美国Cell signalling公司,9718),Comet Assay Kit彗星检测试剂盒(美国Trevigen公司),DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)(上海碧云天生物技术有限公司,C2035S)

1.3 细胞分组及处理

将HVSMC细胞分为对照组(含Ca:1.8 mmol/P:1.0 mmol)、模型组(含Ca:2.7 mmol/P:2.5 mmol)、iATM

组(含10 μmol KU55933、Ca:2.7 mmol/P:2.5 mmol)、iPARP组(含10 μmol PJ34、Ca:2.7 mmol/P:2.5 mmol),每3天换液1次,连续培养12 d,利用光学显微镜和茜素红S染色定性观察及 σ -甲酚酞检测定量分析对照组和模型组第3、6、9、12天的细胞内钙质沉积情况。

1.4 方法

1.4.1 HVSMC钙化程度定性、定量测定 ①茜素红-S染色法定性分析:茜素红-s染色法鉴定细胞的钙盐沉积,光镜下观察细胞外基质呈现橙色着色、细胞呈淡紫色着色为钙盐沉积染色阳性。②邻-甲酚酞法定量检测:弃去上层培养液,PBS缓冲液洗涤细胞3次,0.6 mol/L盐酸脱钙,37℃脱钙24 h。收集上清液用邻-甲酚酞测定盐酸悬液中的钙含量(mmol/L)。剩余细胞提取细胞总蛋白,BCA蛋白检测试剂盒法定定量蛋白含量(g/L)。用蛋白含量校正钙含量(mmol/g)。

1.4.2 彗星试验评估DNA损伤程度 分别用Trevigen Comet Assay Kit彗星检测试剂盒检测对照组和模型组第3、6、9、12天的DNA损伤情况。通过免疫荧光显微镜拍摄受损的细胞图像。从彗星头释放的DNA的程度与DNA的破坏程度成正比。每个视野下计数100个细胞以定量DNA损伤的程度。

1.4.3 Western blotting检测 γ H2AX蛋白的表达 样品裂解、超声、离心后用BCA检测蛋白浓度,预制胶上样(平均20 μg蛋白含量/孔)。120 V电泳90 min,恒压90 V转膜90 min。封闭1 h,孵育一抗4℃过夜,孵育二抗室温避光孵育1.5 h。TBST洗膜3次显色,15 min/次。以 β -actin为内参。使用Odyssey双通道荧光成像仪避光扫膜,保存结果。

1.4.4 8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHDG)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测DNA氧化应激损伤 由于氧化应激是哺乳动物细胞DNA损伤的主要来源,因此评估氧化引起的DNA修饰水平非常重要。鸟嘌呤是最容易被氧化的碱基,而8-OHDG(来自DNA)是最常被研究的氧化鸟嘌呤的形式。依据8-OHDG ELISA试剂盒(ab201734)说明书进行操作,在细胞培养第12天检测模型组和对照组DNA氧化应激损伤。

1.4.5 免疫荧光法检测 γ -H2AX 将在24孔板上盖玻片上生长的细胞用冰冷的PBS洗涤3次,然后在室温下用预热的4%多聚甲醛(PFA)固定并透化10 min, PBS洗涤3次,0.0001%透化,室温下用0.5%

NP-40 浸泡 3 min。将所有细胞在 PBS 中洗涤 3 次,并在 RT 的 3% 牛血清白蛋白溶液或 5% 山羊血清的 PBS 中封闭 1 h,使用一抗 (rH2AX Ser139, 1:200, Cell signalling, # 9718) 在 4 °C 条件下的相同封闭缓冲液中稀释。第 2 天, PBS 洗涤 3 次, 洗去多余的一抗。将细胞与在相同封闭缓冲液中稀释的适当二抗一起在室温下孵育 1 h。然后将样品用 DAPI 染色, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次。最后使用 Mowiol 安装介质在每个盖玻片上安装适当尺寸的盖玻片, Leica SP5 激光扫描共聚焦显微镜捕获共聚焦图像。

1.4.6 HVSMC 细胞活力测定 细胞培养 12 d 时, 将 4 组细胞分别用胰蛋白酶消化, 1 mL 培养液重悬并保存在冰上。将细胞样品倒入微量离心管中, 将 19 体积的细胞悬液加入 1 体积的 VitaBright-48™、

吖啶橙和碘化丙啶混合试剂。将混合的样品添加到 8 腔载玻片上, 立即使用 NucleoCounter® NC-3000™ 高级细胞分析仪测定 HVSMC 细胞活力。

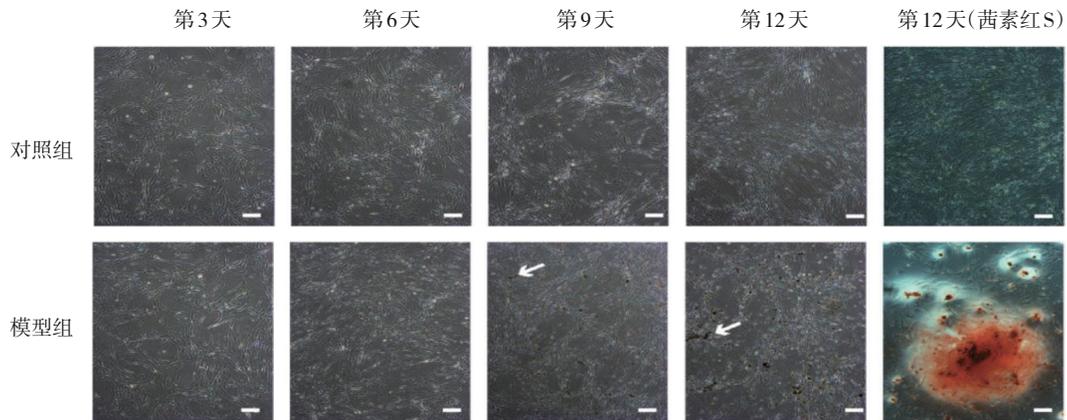
1.5 统计学方法

数据分析采用 Graph Pad Prism 8 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组细胞钙质沉积明显

光学显微镜和茜素红 S 染色发现第 9 天开始, 与对照组相比, 模型组出现细胞内钙质沉积, 第 12 天钙质沉积明显。见图 1。



茜素红 S 染色前为棕色斑点(白色箭头), 染色后为红色。

图 1 对照组和模型组不同时间点 HVSMC 钙化图像 (光学显微镜 × 50)

对照组与模型组分别在第 3、6、9、12 天培养状态下 Ca^{2+} /蛋白比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点 Ca^{2+} /蛋白有差异 ($F = 168.970, P = 0.000$); ②模型组与对照组 Ca^{2+} /蛋白有差异 ($F = 203.040, P = 0.000$), 模型组 Ca^{2+} /蛋白较高, 钙化明显; ③两组 Ca^{2+} /蛋白变化趋势有差异 ($F = 13.213, P = 0.000$)。见表 1。

2.2 模型组细胞钙化可被 iATM、iPARP 抑制

培养 12 d 时, 茜素红 S 染色发现模型组比对照组

表 1 对照组与模型组不同时间点 Ca^{2+} /蛋白比较 (mmol/g, $\bar{x} \pm s$)

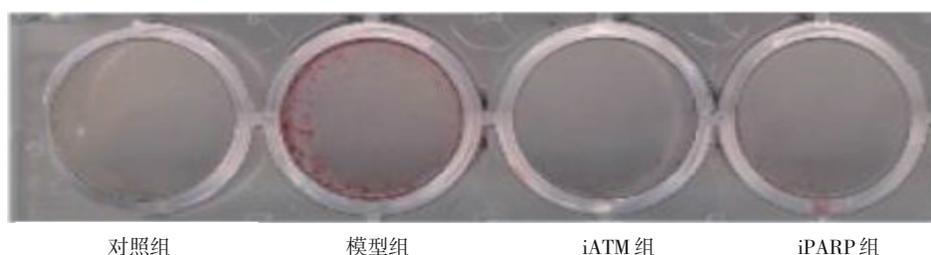
组别	第3天	第6天	第9天	第12天
对照组	0.013 ± 0.010	0.012 ± 0.015	0.021 ± 0.020	0.036 ± 0.024
模型组	0.016 ± 0.011	0.042 ± 0.023	0.043 ± 0.028	1.903 ± 0.810

钙化程度高, iATM 组和 iPARP 组比模型组钙化程度低。σ-甲酚酞试验发现, 对照组、模型组、iATM 组和 iPARP 组 Ca^{2+} /蛋白分别为 (0.036 ± 0.024)、(1.903 ± 0.810)、(0.092 ± 0.043)、(0.109 ± 0.054) mmol/g。经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 4.305, P = 0.000$); iATM 组和 iPARP 组 Ca^{2+} /蛋白低于模型组 ($P < 0.05$)。茜素红 S 染色与 σ-甲酚酞试验结果相一致, 见图 2。

2.3 模型组彗星试验阳性

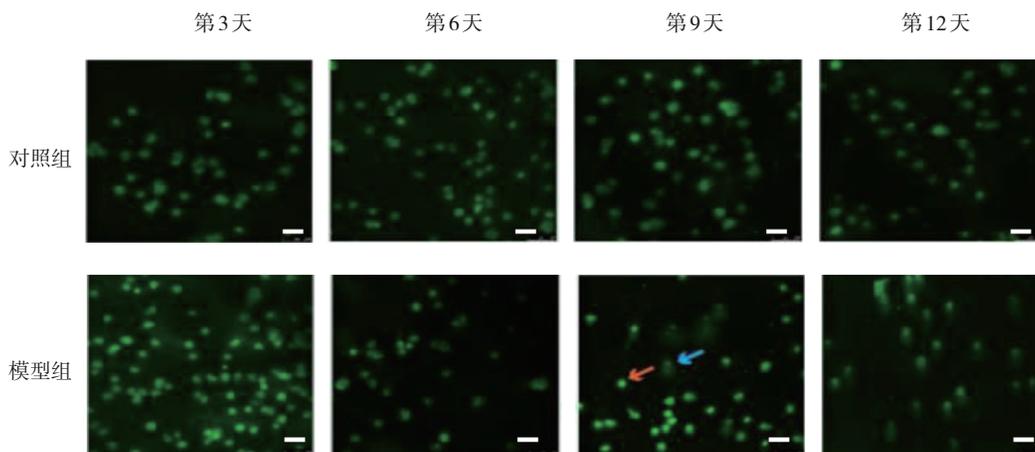
第 3、6、9、12 天时彗星试验结果表明, 对照组相比, 模型组第 9 天开始出现更多数量的 DNA 受损细胞。见图 3。

对照组与模型组分别在第 3、6、9、12 天培养状态下“彗星细胞”比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点“彗星细胞”有差异 ($F = 13.141,$



对照组 模型组 iATM组 iPARP组

图2 4组细胞钙化程度 (茜素红S染色)



橙色箭头:完好无损的细胞;蓝色箭头:损坏的细胞。

图3 对照组和模型组不同时间点彗星试验 (荧光显微镜×50)

$P=0.000$);②模型组与对照组“彗星细胞”有差异($F=121.521, P=0.000$),模型组“彗星细胞”百分比较高, DNA 损伤明显;③模型组与对照组“彗星细胞”变化趋势有差异($F=89.290, P=0.000$)。见表2和图4。

表2 对照组与模型组不同时间点“彗星细胞”比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	第3天	第6天	第9天	第12天
对照组	0.910 ± 0.501	1.102 ± 0.712	10.098 ± 9.879	11.102 ± 8.346
模型组	1.201 ± 0.601	1.221 ± 0.734	25.235 ± 12.387	50.234 ± 12.112

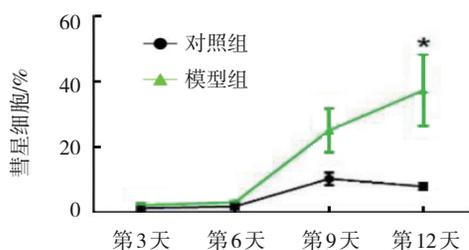


图4 对照组与模型组不同时间点“彗星细胞”变化趋势

2.4 模型组组蛋白 γ H2AX 磷酸化水平升高

细胞培养 12 d 时,模型组、对照组 γ H2AX 蛋白相对表达量分别为 (1.401 ± 1.040) 和 (0.510 ± 0.108),经 t 检验,差异有统计学意义($t=61.070, P=0.000$);模型组 γ H2AX 蛋白相对表达量高于对照组。见图5。

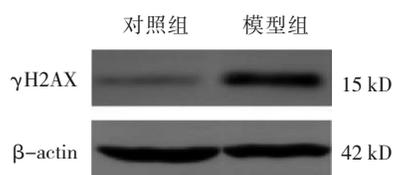


图5 对照组和模型组 γ H2AX 蛋白的表达

对照组、模型组分别在第3和12天免疫荧光显微镜下观察 > 3 个 γ H2AX 病灶百分比,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点 > 3 个 γ H2AX 病灶百分比有差异($F=168.970, P=0.000$);②模型组与对照组 > 3 个 γ H2AX 病灶百分比有差异($F=203.040, P=0.000$),模型组 > 3 个 γ H2AX 病灶百分比较高, DNA 损伤明显;③模型组与对照组 > 3 个

γ H2AX 病灶百分比变化趋势有差异 ($F=153.410$, $P=0.000$)。见表 3 和图 6。

表 3 对照组与模型组不同时间点 > 3 个 γ H2AX 病灶百分比比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 12 天
对照组	14 \pm 7.376	16 \pm 5.689
模型组	33 \pm 10.923	37 \pm 12.234

2.5 模型组 8-OHdG 水平升高

生长 12 d 时, 模型组、对照组 8-OHdG 水平分别

为 (1 238.02 \pm 208.34) 和 (625.01 \pm 89.24) pg/mL, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.033$, $P=0.0240$); 模型组 8-OHdG 水平高于对照组。

2.6 模型组细胞存活率降低可被 iATM、iPARP 抑制

对照组、模型组、iATM 组、iPARP 组 HVSMC 培养 12 d 细胞存活率分别为 (95.45 \pm 4.10)%、(42.10 \pm 5.56)%、(94.41 \pm 4.22)%、(95.43 \pm 5.19)%。经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=102.402$, $P=0.000$)。模型组细胞存活率低于对照组、iATM 组、iPARP 组 ($P<0.05$); iATM 组、iPARP 组与对照组细胞存活率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

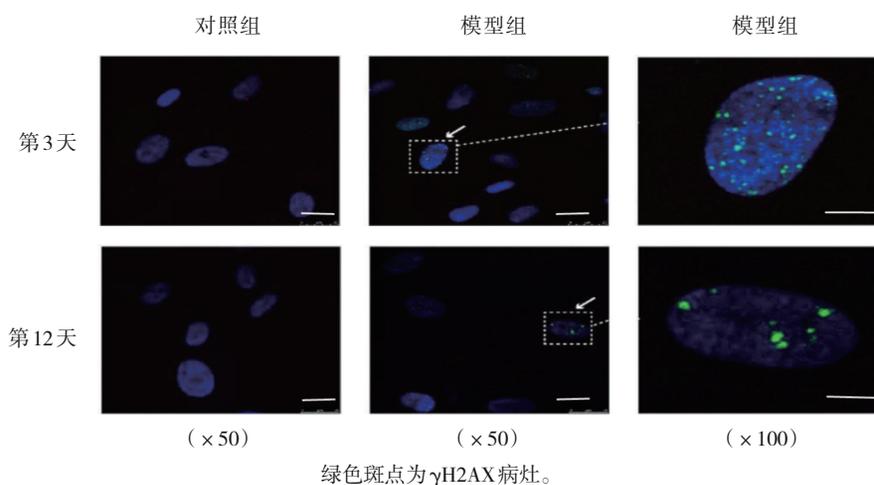


图 6 对照组和模型组不同时间点 γ H2AX 病灶

3 讨论

CKD 患者肾小球滤过率 < 60 mL/min 时, 心血管疾病的风险会逐渐增加^[10]。终末期时持续透析治疗产生的钙磷失衡导致血管钙化是 CKD 患者并发心血管疾病死亡的主要原因^[11-13]。

有研究者利用高磷酸盐诱导牛主动脉平滑肌细胞的体外钙化模型, 发现高磷酸盐可诱发线粒体膜电位和线粒体活性氧, 引起 DNA 损伤^[14]。本研究采用高 Ca^{2+}/P 诱导 HVSMC 钙化模拟肾衰竭患者因多次透析造成的钙磷失衡导致的血管钙化。光学显微镜和茜素红 S 染色发现高 Ca^{2+}/P 培养 HVSMC 至第 9 天, 细胞内出现钙质沉积, 第 12 天时钙质沉积明显, 提示高 Ca^{2+}/P 诱导了 HVSMC 钙化。 σ -甲酚酞定量检测发现模型组与对照组相比, 第 12 天时细胞内钙化量升高, 与茜素红 S 染色结果一致, 表明细胞钙化模型成功建立。

彗星试验是检测细胞 DNA 单、双链损伤水平的

技术。受损的细胞类似于“彗星”, 具有明显的头和尾。头部由完整的 DNA 组成, 而尾巴则由受损或破碎的 DNA 片段组成。从彗星头释放的 DNA 的程度与 DNA 的破坏程度成正比。通过彗星试验发现血管钙化过程中伴随 DNA 损伤, 且 DNA 损伤的程度与细胞钙化程度相匹配。进一步通过 Western blotting 和免疫荧光分析发现 DNA 双链损伤标志物组蛋白 H2AX 磷酸化阳性, 验证了高 Ca^{2+}/P 诱导 HVSMC 钙化过程中伴随 DNA 损伤。值得注意的是, 从第 3 天开始, 在钙化条件下可检测到 γ H2AX 病灶, 并且经过 12 d 的钙化处理而变得更大。提示 DNA 损伤出现在钙化灶形成前。

有研究发现 CKD 患者钙磷代谢失调可能在 VSMCs 中诱导氧化应激^[15]。本研究中 8-OHdG 试验发现在细胞培养第 12 天时, 高 Ca^{2+}/P 培养基中钙化细胞中氧化应激水平较高。表明 Ca^{2+}/P 组出现更多的氧化应激, 及氧化应激对遗传物质的破坏。说明血管钙化过程中 DNA 损伤主要来源于氧化应激。

另外,氧化应激在 CKD 患者中很普遍^[16-18]。钙化细胞中 DNA 和 RNA 氧化产物升高表明了本研究模型中 DNA 损伤的氧化性质。这种氧化应激可能是由线粒体功能失调引起的^[10]。氧化的 DNA 损伤会随着时间流逝而成为另一种 DNA 损伤(例如单链断裂和双链断裂),引发 DDR 信号转导级联反应。

DDR 信号通路通过启动和协调 DNA 修复机制与适当的细胞周期阻滞检查点以维持基因组稳定性^[19]。典型的 DDR 级联反应始于发现 DNA 损伤。不同类型的分子复合物可感知不同类型的 DNA 损伤,其中比较常见的信号转导蛋白是 ATM,可检测到双链断裂(double strand break, DSB)^[20],另一个比较重要的信号转导蛋白是 PARP,在 DSB 和单链断裂(single strand break, SSB)检测和修复中起关键作用^[21]。ATM 和 PARP 都是 DDR 通路级联反应中的关键靶点^[22]。

本研究选 PARP 通路抑制剂 PJ34 及 ATM 通路抑制剂 KU55933 与高 Ca²⁺/P 培养基共培养,发现阻断 DDR 信号通路可以抑制 DNA 损伤导致的 DDR 通路开启,阻止高钙磷诱导的钙化,防止细胞钙化和细胞死亡。细胞活力分析发现高 Ca²⁺/P 培养导致细胞死亡增加了近 40%,然而细胞死亡能被 iATM、iPARP 抑制。进一步反映高 Ca²⁺/P 环境能够激活 DNA 损伤应答信号通路,诱导细胞坏死成为钙化点,最终造成血管钙化。

综上所述,本研究利用高 Ca²⁺/P 成功构建 CKD 患者的钙磷失衡体外模型。通过对模型第 3、6、9、12 天 HVSMCs 进行多项试验,发现 HVSMCs 钙化早期就存在 DNA 损伤。抑制 DDR 信号通路可抑制细胞 DNA 损伤引起的细胞坏死,从而阻断钙化进程。然而,具体的信号通路及涉及到的靶点有待进一步研究。

参 考 文 献 :

- [1] 陈孟华,余学清.慢性肾脏疾病非透析患者高磷血症的管理[J].中华肾脏病杂志,2020,36(2):154-159.
- [2] 于长青,林洪丽.慢性肾脏病血管钙化与矿物质代谢的相互作用:老问题新观点[J].中国实用内科杂志,2022,42(10):847-850.
- [3] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. PDK4 promotes vascular calcification by interfering with autophagic activity and metabolic reprogramming[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 991.
- [4] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. Metformin attenuates hyperlipidaemia-associated vascular calcification through anti-ferroptotic effects[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 229-242.
- [5] 孙学娇,刘乃丰.关注糖尿病与血管钙化的共同发病机制和临床意义[J].中国动脉硬化杂志,2020,28(2):169-174.
- [6] PRIANTE G, MEZZABOTTA F, CRISTOFARO R, et al. Cell

death in ectopic calcification of the kidney[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 466.

- [7] NOWAK K L, CHONCHOL M. Chapter 62 - management of mineral and bone disorders in chronic kidney disease[M]//2nd Ed. KIMMEL P L, ROSENBERG M E. Chronic Renal Disease. London, United Kingdom: Academic Press, 2020: 1013-1033.
- [8] DISTHABANCHONG S, SRISUWARN P. Mechanisms of vascular calcification in kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(6): 417-426.
- [9] PIEKAROWICZ K, MACHOWSKA M, DZIANISAVA V, et al. Hutchinson-gilford progeria syndrome-current status and prospects for gene therapy treatment[J]. Cells, 2019, 8(2): 88.
- [10] 陈西霞,王勇.慢性肾脏病患者心血管钙化形成机制及其对心脏结构与功能的影响[J].中日友好医院学报,2020,34(5):292-295.
- [11] 吴明,林评兰,叶朝阳.慢性肾脏病血管钙化的研究进展[J].中国血液净化,2018,17(6):361-365.
- [12] GROOTAERT M O J, MOULIS M, ROTH L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4): 622-634.
- [13] 卢莹莹,巴应贵.氧化应激与慢性肾脏病血管钙化关系的研究进展[J].中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(35):24.
- [14] CASTAGNA A, GARERI P, FALVO F, et al. Werner syndrome: a rare mutation[J]. Aging Clin Exp Res, 2019, 31(3): 425-429.
- [15] 于涵,王保兴.慢性肾脏病血管钙化的分子机制研究进展[J].中华肾病研究电子杂志,2021,10(4):232-235.
- [16] 汪晓晨,王立婷,汤日宁,等.慢性肾脏病患者心脏瓣膜钙化的研究进展[J].中华肾脏病杂志,2020,36(11):876-880.
- [17] 孔淑君,陈卫东.慢性肾脏病患者血脂变化特征及与氧化应激相关性研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2020,41(1):20-24.
- [18] 石承乾,张冰冰,鲁科达,等.氧化应激状态对慢性肾脏病的影响研究进展[J].浙江医学,2020,42(20):2244-2248.
- [19] ZHAO Z, DONG Q Y, LIU X H, et al. Dynamic transcriptome profiling in DNA damage-induced cellular senescence and transient cell-cycle arrest[J]. Genomics, 2020, 112(2): 1309-1317.
- [20] BLACKFORD A N, JACKSON S P. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response[J]. Mol Cell, 2017, 66(6): 801-817.
- [21] LORD C J, ASHWORTH A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic[J]. Science, 2017, 355(6330): 1152-1158.
- [22] WU K, CHEN Z J, PENG Q, et al. Ku86 alleviates human umbilical vein endothelial cellular apoptosis and senescence induced by a low dose of ionizing radiation[J]. J Int Med Res, 2019, 47(2): 893-904.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 范志娟,刘树业,田亚琼,等. DNA 损伤应答通路在高钙磷环境诱导的人主动脉血管平滑肌细胞钙化中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(16): 36-42.

Cite this article as: FAN Z J, LIU S Y, TIAN Y Q, et al. The role of DNA damage response pathway in HVSMC calcification induced by high calcium and phosphorus[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(16): 36-42.