doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.12.007

中介素 1-53 对高磷诱导人主动脉血管平滑肌细胞 ERS- 线粒体凋亡通路及钙化的影响 *

刘 鹏[1] 曹 露[2] 徐一君[1] 陈志强[1] 温 文[1]

（1 山西省心血管病医院心血管外科 山西 太原 030024；2 山西省中西医结合医院检验科 山西 太原 030013）

摘要 目的：探讨中介素 1-53（IMD1-53）对高磷诱导人主动脉血管平滑肌细胞（HA-VSMC）内质网应激（ERS）- 线粒体凋亡通路及钙化的影响。**方法：**体外培养 HA-VSMC，MTT 法检测 IMD1-53 对 HA-VSMC 的毒性作用。HA-VSMC 中添加 10 mmol/L β- 甘油磷酸盐进行高磷诱导，使用 0.1 nmol/L 或 0.5 nmol/L IMD1-53 干预，并在 0.5 nmol/L IMD1-53 干预基础上添加 ERS 诱导剂衣霉素（TM），流式细胞仪检测 HA-VSMC 凋亡率，茜素红 S 染色观察 HA-VSMC 中钙盐沉积，酞络合酮比色法测定 HA-VSMC 中钙含量，分光光度法检测 HA-VSMC 中碱性磷酸酶（ALP）活性，蛋白质印迹法（Western blot）检测 HA-VSMC 中钙化以及 ERS-- 线粒体凋亡通路相关蛋白表达。**结果：**IMD1-53 浓度≤ 2.5 nmol/L 时，对 HA-VSMC 细胞活力无明显影响（P＞0.05），故选择对细胞无明显毒副作用的低、高 2 个剂量（0.1、0.5 nmol/L）进行后续实验。高磷诱导后，HA-VSMC 凋亡率、钙含量、ALP 活性以及 Runt 相关转录因子 -2（Runx2）、骨桥蛋白（OPN）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）、裂解的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 -3（cleaved caspase-3）、葡萄糖调节蛋白 78（GRP78）、C/EBP 同源蛋白（CHOP）、感受器活化转录因子 6（ATF6）、p- 需肌醇酶 1（IRE1）/IRE1 蛋白表达水平升高（P＜0.05），橘红色结节明显增多，骨保护素（OPG）、B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2（Bcl-2）蛋白表达水平降低（P＜0.05）。0.1 nmol/L 和 0.5 nmol/L IMD1-53 干预处理均可降低 HA-VSMC 凋亡率、钙含量、ALP 活性以及 Runx2、OPN、Bax、cleaved caspase-3、GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平（P＜0.05），明显减少橘红色结节，升高 OPG、Bcl-2 蛋白表达水平（P＜0.05）。ERS 诱导剂 TM 可升高 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平，并减弱 IMD1-53 抑制高磷诱导的 HA-VSMC ERS、凋亡和钙化的作用。**结论：**IMD1-53 可减轻高磷诱导的 HA-VSMC 钙化，其作用机制可能与抑制 ERS- 线粒体凋亡通路激活，减少细胞凋亡有关。

关键词：中介素 1-53；人主动脉血管平滑肌细胞；内质网应激 - 线粒体凋亡通路；钙化

中图分类号：R-33；R543.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2023）12-2240-07

Effects of Intermedin 1-53 on ERS Mitochondrial Apoptosis Pathway and Calcification in Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells Induced by High Phosphorus*

LIU Peng[1], CAO Lu[2], XU Yi-jun[1], CHEN Zhi-qiang[1], WEN Wen[1]

(1 Department of Cardiovascular Surgery, Shanxi Provincial Cardiovascular Hospital, Taiyuan, Shanxi, 030024, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Shanxi Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan, Shanxi, 030013, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of intermedin 1-53 (IMD1-53) on endoplasmic reticulum stress (ERS) -mitochondrial apoptosis pathway and calcification in human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMC) induced by high phosphorus. **Methods:** HA-VSMC was cultured in vitro, MTT method was used to detect the toxicity of IMD1-53 on HA-VSMC. 10 mmol/L β-glycerophosphate was added to HA-VSMC for high phosphorus induction, 0.1 nmol/L or 0.5 nmol/L IMD1-53 was used for intervention, and the ERS inducer tunicamycin (TM) was added on the basis of 0.5 nmol/L IMD1-53 intervention, the apoptosis rate of HA-VSMC was detected by flow cytometry, Alizarin red S staining was used to observe calcium salt deposition in HA-VSMC, the calcium content in HA-VSMC was determined by phthalein complexing ketone colorimetry, the activity of alkaline phosphatase (ALP) in HA-VSMC was detected by spectrophotometry, Western blot was used to detect calcification and expression of proteins related to ERS mitochondrial apoptosis pathway in HA-VSMC. **Results:** When IMD1-53 concentration ≤ 2.5 nmol/L, it had no significant effect on the viability of HA-VSMC cells (P>0.05), therefore, low and high doses (0.1 and 0.5 nmol/L) without obvious toxic and side effects on cells were selected for subsequent experiments. After high phosphorus induction, the apoptosis rate of HA-VSMC, calcium content, ALP activity, the expression levels of Runt related transcription factor-2 (Runx2), osteopontin (OPN), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase-3, glucose regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), activating transcription factor 6 (ATF6) p-inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)/IRE1 proteins increased (P<0.05), orange nodules increased obviously, and the expression levels of

* 基金项目：山西省重点研发项目（201603D321057）；山西省心血管病医院基金资助项目（XYS20170302）

作者简介：刘鹏（1987-），男，硕士，主治医师，主要从事冠心病基础与临床方向的研究，E-mail: Pl682097@126.com

（收稿日期：2023-01-28 接受日期：2023-02-26）

osteoprotegerin (OPG) and B cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2) proteins decreased ($P<0.05$). 0.1 nmol/L and 0.5 nmol/L IMD1-53 intervention treatment were able to reduce the apoptosis rate of HA-VSMC, calcium content, ALP activity, the expression levels of Runx2, OPN, Bax, cleaved caspase-3, GRP78, CHOP, ATF6, p-IRE1/IRE1 proteins ($P<0.05$), obviously reduce the orange nodules, and increase the expression levels of OPG and Bcl-2 proteins ($P<0.05$). The ERS inducer TM was able to increase the expression levels of GRP78, CHOP, ATF6, p-IRE1/IRE1 proteins in HA-VSMC, and weaken the inhibition of IMD1-53 on ERS, apoptosis and calcification induced by hyperphosphate in HA-VSMC. **Conclusion:** IMD1-53 can reduce the calcification of HA-VSMC induced by high phosphorus, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of ERS mitochondrial apoptosis pathway, and reducing cell apoptosis.

Key words: Intermedin 1-53; Human aortic vascular smooth muscle cells; Endoplasmic reticulum stress-mitochondrial apoptosis pathway; Calcification

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2023)12-2240-07

前言

以血管硬度增加和顺应性下降为主要表现的血管钙化与动脉粥样硬化、主动脉瘤等多种疾病的发生发展密切相关，其也是导致心血管疾病发病率和死亡率增加的关键环节[1-3]。血管钙化是一个涉及多种分子途径的复杂过程，与骨形成有高度相似性，血管平滑肌细胞（VSMC）凋亡、VSMC 成骨分化、氧化应激、钙磷沉积、内质网应激（ERS）等均是引起血管钙化的重要机制[4-6]。研究表明，钙磷代谢紊乱引起的高磷血症是血管钙化的始动因素，体内的无机磷通过磷酸转运蛋白进入动脉血管的 VSMC，上调成骨信号通路中 Runt 相关转录因子 -2（Runx2）、骨桥蛋白（OPN）的表达，诱导 VSMC 由正常的收缩表型转分化为成骨细胞表型[7,8]。此外，VSMC 表型转化作为血管钙化进展中的重要因素，与冠心病患者冠脉重建后再狭窄的发生亦密切相关[9,10]。因此，有必要对血管钙化的形成机制和药物干预进行深入探究。中介素（IMD）是一种血管旁分泌 / 自分泌肽，在心血管疾病中发挥多种有益作用，其外源性给药可显著减弱 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖和 ERS，防止内膜增生[11]。另有研究显示，中介素 1-53（IMD1-53）通过抑制巨噬细胞中 C/EBP 同源蛋白（CHOP）（一个参与 ERS 的促凋亡转录因子）介导的细胞凋亡来减轻动脉粥样硬化斑块的易损性 [12]。此外，IMD1-53 通过抑制 Sirt3 介导的线粒体氧化应激发挥减轻 VSMC 钙化的作用[13]。IMD1-53 通过抑制 ERS 来防止同型半胱氨酸诱导的 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化以及人主动脉血管平滑肌细胞（HA-VSMC）钙化[14]。但 IMD1-53 减轻 VSMC 钙化的作用机制目前尚不完全清楚，仍有待进一步探索。因此，本研究通过高磷诱导 HA-VSMC，并使用 IMD1-53 进行干预处理，旨在观察 ERS- 线粒体凋亡通路及 VSMC 钙化的变化，以期为 IMD1-53 用于血管钙化的防治提供理论证据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验细胞 HA-VSMC（YS-1898X）由美国 ScienCell 研究实验室提供。液氮中冻存的 HA-VSMC 解冻、复苏，接种于含 10%胎牛血清和 1%双抗（青霉素和链霉素）的 DMEM/F12 培养基中，置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养，待细胞融合度达到 80%左右时消化传代（1:2 传代），2~3 天换液一次，将对数生长期的细胞用于后续实验。

1.1.2 主要试剂 IMD1-53（重组人 IMD1-53）购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司；MTT（M8180-1）购自北京索莱宝科技有限公司；β- 甘油磷酸盐（G5422-25G）、ERS 诱导剂衣霉素（TM）（T7765）购自美国 sigma 公司；Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（FY600003-20T）购自弗元（上海）生物科技有限公司；茜素红 S 染色液（R22144）购自上海源叶生物科技有限公司；钙含量显色检测试剂盒（XY-1063S0）购自上海信裕生物科技有限公司；兔源一抗葡萄糖调节蛋白 78（GRP78）（PA5-22968）、CHOP（PA5-104528）购自美国 Invitrogen 公司；碱性磷酸酶（ALP）活性测定试剂盒（mlE3570）购自上海酶联生物科技有限公司；兔源一抗 Runx2（ab23981）、OPN（ab63856）、骨保护素（OPG）（ab73400）、B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2（Bcl-2）（ab182858）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）（ab32503）、裂解的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 -3（cleaved caspase-3）（ab2302）、β-actin（ab8227）、感受器活化转录因子 6（ATF6）（ab37149）、需肌醇酶 1（IRE1）（ab37073）、p-IRE1（ab124945）以及二抗 HRP 标记羊抗兔 IgG（ab6721）购自 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法检测 IMD1-53 对 HA-VSMC 的毒性作用 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^3 个 / 孔接种到 96 孔板中，参考文献[14,15]及预实验结果，待细胞贴壁后加入不同浓度 IMD1-53（终浓度为 0、0.1、0.5、2.5、5.0、10.0 nmol/L），常规培养 48 h 后每孔添加 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），继续培养 4 h，使用酶标仪检测各孔在 490 nm 波长处的吸光度（optical density，OD）值（$OD_{490\,nm}$），计算细胞活力。细胞活力（%）= 实验组 $OD_{490\,nm}$/ 对照组 $OD_{490\,nm}\times100\%$。

1.2.2 细胞分组与处理 HA-VSMC 分为正常组、高磷组、IMD1-53 低剂量组（IMD1-53-L 组）、IMD1-53 高剂量组（IMD1-53-H 组）、IMD1-53+ERS 诱导剂组（IMD1-53+TM 组）。其中，正常组细胞使用正常培养基培养；高磷组细胞使用含 10 mmol/L β- 甘油磷酸盐[16]的培养基培养；IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组细胞使用含 10 mmol/L β- 甘油磷酸盐以及 0.1 nmol/L 或 0.5 nmol/L IMD1-53 的培养基培养；IMD1-53+TM 组细胞使用含 10 mmol/L β- 甘油磷酸盐、0.5 nmol/L IMD1-53 和 1 μmol/L TM[17]的培养基培养。

1.2.3 流式细胞仪检测 HA-VSMC 凋亡率 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^4 个 / 孔接种到 12 孔板中，根据 1.2.2 中分组处理 48 h 后收集细胞，PBS 洗涤后添加 Annexin V-FITC 结

合液重悬细胞，接着添加 Annexin V-FITC 和 PI 染色液室温避光孵育 15 min，再次洗涤和重悬细胞后置于流式细胞仪上样管中，使用流式细胞仪自带软件分析细胞凋亡率。

1.2.4 **茜素红 S 染色观察 HA-VSMC 中钙盐沉积** 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^4 个 / 孔接种到 12 孔板中，根据 1.2.2 中分组处理 7 d 后细胞使用 95%乙醇室温固定 30 min，茜素红 S 染色液（pH8.3，0.2%）在 37℃下染色 30 min，倒置荧光显微镜观察钙结节染色情况并拍照（橘红色结节为钙盐沉积）。

1.2.5 **酞络合酮比色法测定 HA-VSMC 中钙含量** 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^5 个 / 孔接种到 6 孔板中，根据 1.2.2 中分组处理 7 d 后弃去细胞培养上清液，PBS 洗涤细胞后加入样品裂解液，离心获取上清液（BCA 法测定蛋白质浓度），使用酶标仪计算钙含量（单位为 mg/g protein）。

1.2.6 **分光光度法检测 HA-VSMC 中 ALP 活性** 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^5 个 / 孔接种到 6 孔板中，根据 1.2.2 中分组处理 7 d 后弃去细胞培养上清液，PBS 洗涤，离心获取上清液（BCA 法测定蛋白质浓度），使用可见分光光度计测量 510 nm 处标准品和样品的吸光度，绘制标准曲线，计算 ALP 活性（单位为 U/g protein）。

1.2.7 **蛋白质印迹法（Western blot）检测 HA-VSMC 中钙化相关蛋白（Runx2、OPN、OPG）、线粒体凋亡相关蛋白（Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3）以及 ERS 标志蛋白（GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1）表达** 对数生长期的 HA-VSMC 以 5×10^5 个 / 孔接种到 6 孔板中，根据 1.2.2 中分组处理 48 h 或 72 h 后收集细胞，添加 RIPA 裂解液使细胞充分裂解提取细胞中总蛋白，BCA 法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白（每泳道上样 20 μg 变性蛋白），切胶后将蛋白转移至 PVDF 膜。5% BSA 室温封闭膜 1.5 h，将膜与一抗（Runx2、OPN、OPG、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1、IRE1、β-actin 抗体）在 4℃下孵育过夜，PBST 洗涤后将膜与二抗（HRP 标记羊抗兔 IgG）在 37℃下孵育 45 min，ECL 试剂显色。凝胶成像系统扫描图像，Image J 软件对蛋白条带灰度行半定量分析（β-actin 为内参）。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析，计量资料以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间以及组间多重比较采用单因素方差分析、SNK-q 检验。$P<0.05$ 提示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IMD1-53 对 HA-VSMC 的毒性作用

如表 1 所示，IMD1-53 浓度≤ 2.5 nmol/L 时，对 HA-VSMC 细胞活力无明显影响（$P>0.05$）。故选择对细胞无明显毒副作用的低、高 2 个剂量（0.1、0.5 nmol/L）进行后续实验。

表 1 不同浓度 IMD1-53 处理后 HA-VSMC 细胞活力比较（$\bar{x}\pm s$, n=6）

Table 1 Comparison of HA-VSMC cell activity after different concentrations of IMD1-53（$\bar{x}\pm s$, n=6）

IMD1-53(nmol/L)	Cell activity(%)
0	101.34±6.57
0.1	96.16±7.64
0.5	94.34±8.05
2.5	91.36±7.96
5.0	80.12±6.58*
10.0	71.35±7.29*

Note: Compared with IMD1-53 0 nmol/L, *$P<0.05$.

2.2 各组 HA-VSMC 凋亡率比较

如图 1、表 2 所示，与正常组比较，高磷组 HA-VSMC 凋亡率升高（$P<0.05$）；与高磷组比较，IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 凋亡率降低，且 IMD1-53-H 组低于 IMD1-53-L 组（$P<0.05$）；与 IMD1-53-H 组比较，IMD1-53+TM 组 HA-VSMC

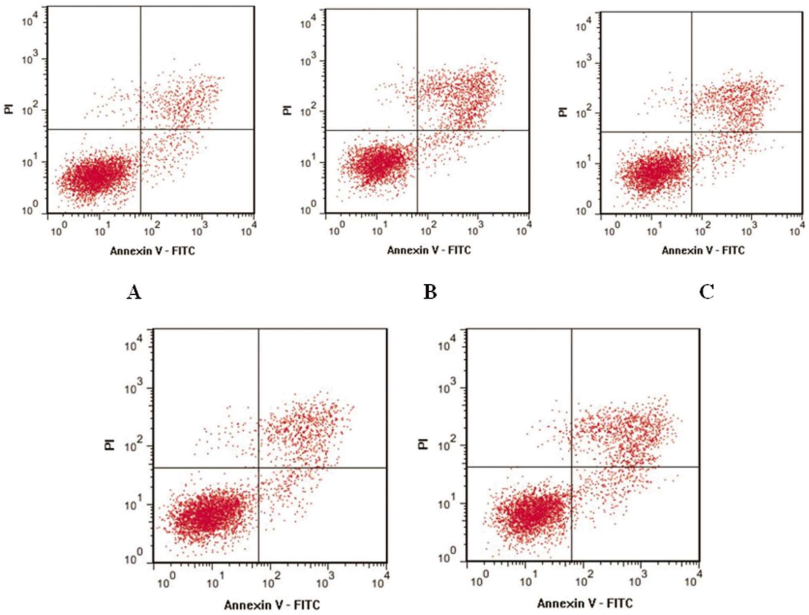

图 1 各组 HA-VSMC 凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of HA-VSMC in each group

Note: A: Normal group; B: High phosphorus group;C:IMD1-53-L group; D: IMD1-53-H group; E: IMD1-53+TM group.

表 2 各组 HA-VSMC 凋亡率比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of HA-VSMC apoptosis rate in each group(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Groups	Apoptosis rate(%)
Normal group	8.64±1.56
High phosphorus group	21.35±2.93*
IMD1-53-L group	17.21±2.52*#
IMD1-53-H group	11.20±1.94*#&
IMD1-53+TM group	18.06±2.19*#▲
F	31.539
P	0.000

Note: Compared with the normal group, *P <0.05. Compared with IMD1-53-L group, &P<0.05. Compared with high phosphorus group, #P<0.05. Compared with IMD1-53-H group, ▲P<0.05.

凋亡率升高(P<0.05)。

2.3 各组 HA-VSMC 茜素红 S 染色结果、钙含量和 ALP 活性比较

如图 2 所示,茜素红 S 染色可见:正常组 HA-VSMC 中几乎无橘红色结节;而与正常组比较,高磷组 HA-VSMC 中橘红色结节明显增多;与高磷组比较,IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 中橘红色结节明显减少,且 IMD1-53-H 组少于 IMD1-53-L 组;与 IMD1-53-H 组比较,IMD1-53+TM 组 HA-VSMC 中橘红色结节增多。如表 3 所示,与正常组比较,高磷组 HA-VSMC 中钙含量、ALP 活性升高(P<0.05);与高磷组比较,IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 中钙含量、ALP 活性降低,且 IMD1-53-H 组低于 IMD1-53-L 组(P<0.05);与 IMD1-53-H 组比较,IMD1-53+TM 组 HA-VSMC 中钙含量、ALP 活性升高(P<0.05)。

2.4 各组 HA-VSMC 中钙化相关蛋白(Runx2、OPN、OPG)表达水平比较

如图 3、表 4 所示,与正常组比较,高磷组 HA-VSMC 中 Runx2、OPN 蛋白表达水平升高,OPG 蛋白表达水平降低(P<0.05);与高磷组比较,IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 中 Runx2、OPN 蛋白表达水平降低,OPG 蛋白表达水平升高,且 IMD1-53-H 组各蛋白变化更为显著(P<0.05);与IMD1-53-H 组比较,IMD1-53+TM 组 HA-VSMC 中 Runx2、OPN 蛋白表达水平升高,OPG 蛋白表达水平降低(P<0.05)。

2.5 各组 HA-VSMC 中线粒体凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3)表达水平比较

如图 4、表 5 所示,与正常组比较,高磷组 HA-VSMC 中 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达水平升高(P<0.05);与高磷组比较,IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 中 Bcl-2 蛋白表达水平升高,Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达水平降低,且 IMD1-53-H 组各蛋白变化更为显著(P<0.05);与 IMD1-53-H 组比较,IMD1-53+TM 组 HA-VSMC 中 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达水平升高(P<0.05)。

2.6 各组 HA-VSMC 中 ERS 标志蛋白(GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1)表达水平比较

如图 5、表 6 所示,与正常组比较,高磷组 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平升高(P<0.05);与高磷组比较,IMD1-53-L 组、IMD1-53-H 组 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平降低,且 IMD1-53-H 组低于 IMD1-53-L 组(P<0.05);与 IMD1-53-H 组比较,IMD1-53+TM 组 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平升高(P<0.05)。

3 讨论

血管钙化作为动脉粥样硬化、动脉狭窄等疾病发生和进展过程中常见的病理生理现象,不仅是心血管疾病发生的重要危

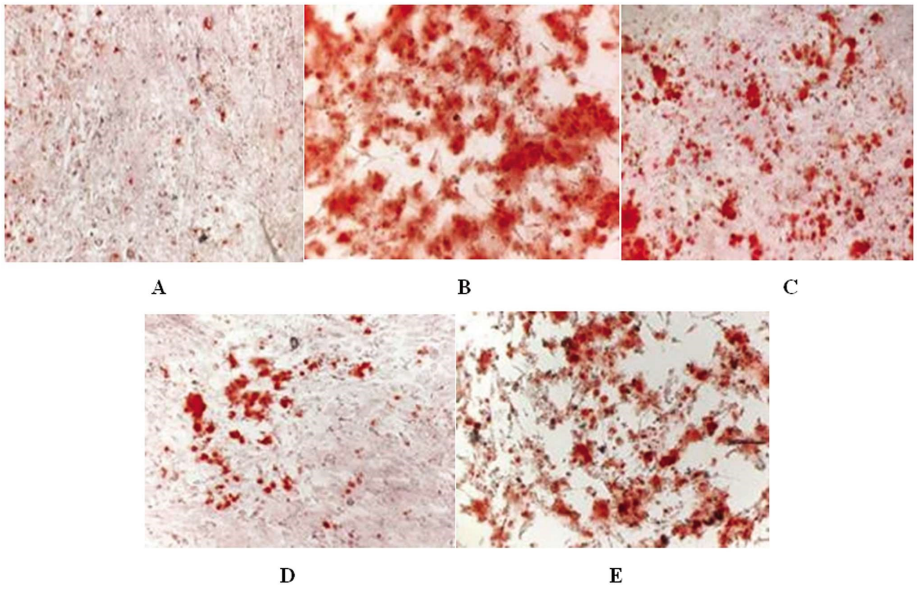

图 2 各组 HA-VSMC 茜素红 S 染色结果(×200)

Fig.2 Alizarin red S staining results of HA-VSMC in each group(×200)

Note: A: Normal group; B: High phosphorus group; C: IMD1-53-L group; D: IMD1-53-H group; E: IMD1-53+TM group.

表 3 各组 HA-VSMC 中钙含量和 ALP 活性比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of calcium content and ALP activity in HA-VSMC in each group(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Groups	Calcium content(mg/g protein)	ALP activity(U/g protein)
Normal group	25.18±4.32	22.34±4.96
High phosphorus group	90.34±6.85*	75.28±7.03*
IMD1-53-L group	71.25±6.24*#	58.96±6.85*#
IMD1-53-H group	43.51±5.67*#&	35.24±5.48*#&
IMD1-53+TM group	76.24±7.05*#▲	64.57±6.54*#▲
F	112.140	73.798
P	0.000	0.000

Note: Compared with the normal group,*$P<0.05$.Compared with IMD1-53-L group, &$P<0.05$.Compared with high phosphorus group, #$P<0.05$. Compared with IMD1-53-H group,▲$P<0.05$.

险因素,还是患者死亡的独立预测因子[18,19]。目前已经证实血管钙化与 VSMC 过度凋亡、表型转化等生物学过程有关 [20],且 VSMC 钙化是由各种信号通路、细胞因子以及钙磷平衡失调等参与的主动、可控过程[21,22]。因此,积极寻找抑制 VSMC 钙化的药物具有重要意义。

本研究通过添加 β- 甘油磷酸盐使 HA-VSMC 暴露于高磷环境,结果显示,高磷诱导后 HA-VSMC 中钙含量、ALP(血管钙化发生的经典生物标志物)活性以及 Runx2、OPN 蛋白表达水平升高,钙盐沉积增多,同时 OPG(破骨细胞形成、分化的重要调控因子)蛋白表达水平降低。表明高磷诱导 HA-VSMC 成骨转化,并促进 HA-VSMC 发生钙化。已有研究证实 IMD1-53 是一种抑制血管钙化的生物活性肽,比如:外源性给予 IMD1-53 可显著降低维生素 D3 联合尼古丁诱导的老年大鼠钙沉积和 VSMC 成骨转化,减轻衰老相关的血管钙化[23];IMD1-53 通过环磷酸腺苷 / 蛋白激酶 A 通路抑制 ERS 减轻 VSMC 钙化[24]。本研究中,0.1 nmol/L 和 0.5 nmol/L IMD1-53 干预处理后,高磷诱导的 HA-VSMC 成骨转化和钙化均减弱,且 0.5 nmol/L IMD1-53 作用效果更显著,表明 IMD1-53 可抑制高磷诱导的 HA-VSMC 钙化,与 Chang 等[24]研究结论一致。

VSMC 凋亡是血管钙化启动的关键过程之一,而线粒体碎片化是导致细胞凋亡的重要因素,且有研究显示 ERS 可以通过未折叠蛋白反应促进 VSMC 成骨表型转化、凋亡,调控血管钙化的发生与发展 [25,26]。故 ERS- 线粒体凋亡通路可能在

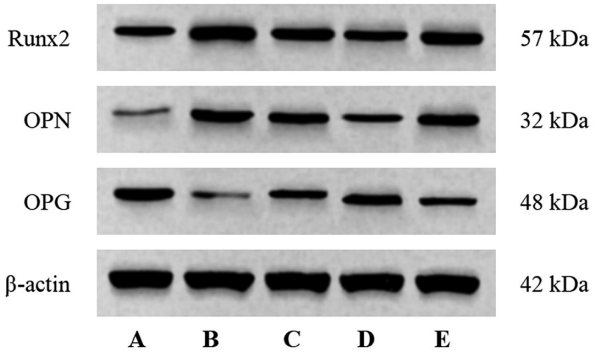

图 3 各组 HA-VSMC 中 Runx2、OPN、OPG 蛋白表达

Fig.3 Expression of Runx2, OPN and OPG proteins of HA-VSMC in each group

Note: A: Normal group; B: High phosphorus group; C: IMD1-53-L group; D: IMD1-53-H group; E: IMD1-53+TM group

VSMC 钙化中发挥重要调控作用。ERS 发生时,高表达的 CHOP 蛋白下调线粒体外膜上 Bcl-2 表达,上调与 Bcl-2 对应的 Bax 表达,使线粒体外膜孔径变大,引发膜的通透性发生改变,导致线粒体中细胞色素 C 释放以及凋亡诱导因子大量表达,继而引起 caspase 级联反应中 caspase-3 等蛋白的表达,从而引起细胞凋亡[27,28]。本研究结果显示,高磷诱导后,HA-VSMC 凋亡率、促线粒体凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 表达水平升高,而抗线粒体凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平降低,同时 ERS 标

表 4 各组 HA-VSMC 中 Runx2、OPN、OPG 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 4 Comparison of Runx2, OPN and OPG protein expression levels in HA-VSMC in each group($\bar{x}\pm s$, n=6)

Groups	Runx2/β-actin	OPN/β-actin	OPG/β-actin
Normal group	0.35±0.05	0.12±0.03	0.59±0.04
High phosphorus group	0.66±0.07*	0.56±0.05*	0.14±0.03*
IMD1-53-L group	0.54±0.06*#	0.43±0.05*#	0.26±0.04*#
IMD1-53-H group	0.41±0.06*#&	0.22±0.04*#&	0.45±0.05*#&
IMD1-53+TM group	0.57±0.07*#▲	0.48±0.05*#▲	0.21±0.04*#▲
F	24.046	102.36	125.671
P	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the normal group, *$P<0.05$. Compared with IMD1-53-L group, &$P<0.05$. Compared with high phosphorus group, #$P<0.05$. Compared with IMD1-53-H group, ▲$P<0.05$.

志蛋白 GRP78、CHOP、ATF6、磷酸化 IRE1 表达水平均升高。提示高磷可诱导 HA-VSMC 发生 ERS，促进细胞线粒体凋亡通路激活，诱导细胞凋亡。而外源性给予 IMD1-53 后，HA-VSMC 凋亡率、Bax、cleaved caspase-3 以及 ERS 标志蛋白表达水平均明显降低，且 Bcl-2 表达水平升高，表明 IMD1-53 可改善 HA-VSMC 凋亡，抑制 ERS- 线粒体凋亡通路激活。此外，为了更充分地验证 ERS- 线粒体凋亡通路在 HA-VSMC 钙化中的作用，本研究在 IMD1-53 干预基础上添加 ERS 诱导剂 TM，结果显示：TM 可升高 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、磷酸化 IRE1 蛋白表达水平，并减弱 IMD1-53 抑制高磷诱导的 HA-VSMC ERS、线粒体凋亡和钙化的作用。以上这些结果表明，IMD1-53 可能通过抑制 ERS- 线粒体凋亡通路激活减少细胞凋亡，减轻高磷诱导的 HA-VSMC 钙化。此外，小檗碱能够通过抑制 ERS 有效改善血管钙化[29]。肾元颗粒可改善糖尿病肾病 db/db 模型小鼠的肾功能及血管钙化程度，其机制可能与改善线粒体介导的 VSMC 凋亡有关[30]，这与本研究结果具有一定相似性。

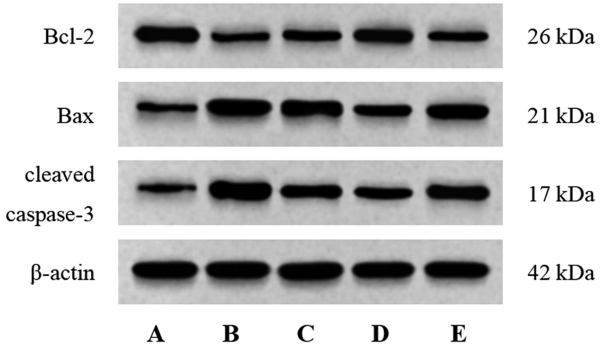

图 4 各组 HA-VSMC 中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达

Fig.4 Expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 in HA-VSMC in each group

Note: A: Normal group; B: High phosphorus group; C: IMD1-53-L group; D: IMD1-53-H group; E: IMD1-53+TM group.

表 5 各组 HA-VSMC 中 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$，n=6)

Table 5 Comparison of expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 in HA-VSMC in each group($\bar{x}\pm s$, n=6)

Groups	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	cleaved caspase-3/β-actin
Normal group	0.85±0.06	0.36±0.04	0.27±0.04
High phosphorus group	0.32±0.05*	1.02±0.06*	0.96±0.05*
IMD1-53-L group	0.45±0.06*#	0.84±0.06*#	0.78±0.06*#
IMD1-53-H group	0.69±0.05*#&	0.57±0.05*#&	0.51±0.05*#&
IMD1-53+TM group	0.38±0.06*#▲	0.86±0.05*#▲	0.82±0.06*#▲
F	95.259	149.783	165.370
P	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the normal group, *$P<0.05$. Compared with IMD1-53-L group, &$P<0.05$. Compared with high phosphorus group, #$P<0.05$. Compared with IMD1-53-H group, ▲$P<0.05$.

综上所述，IMD1-53 可减轻高磷诱导的 HA-VSMC 钙化，其作用机制可能与抑制 ERS- 线粒体凋亡通路激活，减少细胞凋亡有关。本研究为 IMD1-53 用于血管钙化的防治提供了理论依据。但本研究尚存在一定不足之处，比如：未检测线粒体膜电位变化，未使用 ERS 抑制剂进行验证等，另外 IMD1-53 亦可能通过其他途径影响 VSMC 钙化，仍有待接下来的研究进行补充完善。

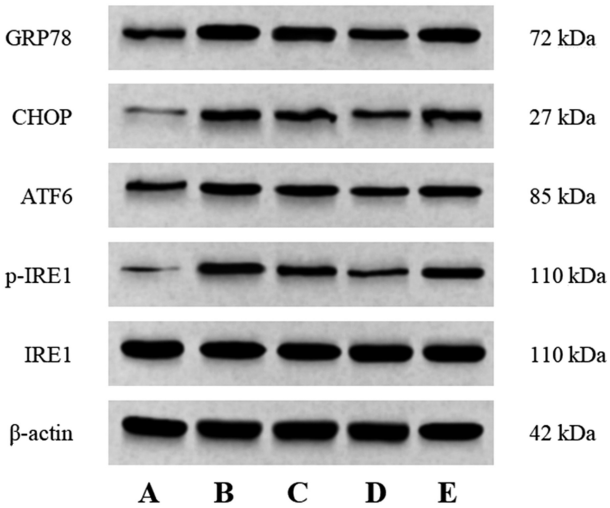

图 5 各组 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1、IRE1 蛋白表达

Fig.5 Protein expressions of GRP78, CHOP, ATF6, p-IRE1 and IRE1 in HA-VSMC in each group

Note: A: Normal group; B: High phosphorus group; C: IMD1-53-L group; D:IMD1-53-H group; E: IMD1-53+TM group.

参 考 文 献(References)

[1] Durham AL, Speer MY, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4): 590-600

[2] Petsophonsakul P, Furmanik M, Forsythe R, et al. Role of vascular smooth muscle cell phenotypic switching and calcification in aortic aneurysm formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(7): 1351-1368

[3] Voelkl J, Luong TT, Tuffaha R, et al. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF-κB signaling [J]. J Clin Invest, 2018, 128(7): 3024-3040

[4] 梁英权，段亚君，韩际宏. 血管钙化分子机制研究进展[J]. 中国动脉

表 6 各组 HA-VSMC 中 GRP78、CHOP、ATF6、p-IRE1/IRE1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$，n=6)

Table 6 Comparison of protein expression levels of GRP78, CHOP, ATF6 and p-IRE1/IRE1 in HA-VSMC in each group($\bar{x}\pm s$, n=6)

Groups	GRP78/β-actin	CHOP/β-actin	ATF6/β-actin	p-IRE1/IRE1
Normal group	0.36±0.05	0.11±0.03	0.24±0.04	0.10±0.03
High phosphorus group	0.79±0.07*	0.42±0.05*	0.51±0.05*	0.46±0.04*
IMD1-53-L group	0.67±0.06*#	0.34±0.05*#	0.42±0.04*#	0.35±0.05*#
IMD1-53-H group	0.45±0.05*#&	0.21±0.04*#&	0.31±0.05*#&	0.19±0.04*#&
IMD1-53+TM group	0.72±0.07*#	0.38±0.05*#	0.45±0.04*#	0.43±0.05*#
F	55.223	49.710	36.520	79.879
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the normal group, *P<0.05. Compared with IMD1-53-L group, &P<0.05. Compared with high phosphorus group, #P<0.05. Compared with IMD1-53-H group, ▲P<0.05.

硬化杂志, 2020, 28(11): 921-929

[5] Furmanik M, van Gorp R, Whitehead M, et al. Endoplasmic reticulum stress mediates vascular smooth muscle cell calcification via increased release of Grp78 (Glucose-Regulated Protein, 78 kDa) -loaded extracell ular vesicles [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(2): 898-914

[6] Jaminon A, Reesink K, Kroon A, et al. The role of vascular smooth muscle cells in arterial remodeling: focus on calcification-related processes[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5694

[7] 周薇, 徐金升, 白亚玲, 等. miR-30b 在高磷诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 54-59

[8] 林评兰, 吴明, 杨枫, 等. 丹酚酸 B 激活自噬改善高磷诱导血管平滑肌细胞钙化的机制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(12): 1192-1196

[9] Chakraborty R, Chatterjee P, Dave JM, et al. Targeting smooth muscle cell phenotypic switching in vascular disease[J]. JVS Vasc Sci, 2021, 2(5): 79-94

[10] Jain M, Dev R, Doddapattar P, et al. Integrin α9 regulates smooth muscle cell phenotype switching and vascular remodeling [J]. JCI Insight, 2021, 6(10): e147134

[11] Xue CD, Chen Y, Ren JL, et al. Endogenous intermedin protects against intimal hyperplasia by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. Peptides, 2019, 121: 170131

[12] Ren JL, Chen Y, Zhang LS, et al. Intermedin1-53 attenuates atherosclerotic plaque vulnerability by inhibiting CHOP-mediated apoptosis and inflammasome in macrophages [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 436

[13] Liu SM, Zhang YR, Chen Y, et al. Intermedin alleviates vascular calcification in CKD through Sirtuin 3-mediated inhibition of mitochondrial oxidative stress[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15 (10): 1224

[14] Ren JL, Hou YL, Ni XQ, et al. Intermedin1-53 ameliorates homocysteine-promoted atherosclerotic calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther,2020, 25(3): 251-264

[15] Ni XQ, Lu WW, Zhang JS, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin1-53 attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in ApoE KO Mice[J]. Endocrine, 2018, 62(1): 90-106

[16] 张东雪, 高少辉, 张胜雷. SET8 介导 AKT 信号通路在调控高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36 (3): 214-220

[17] Li Y, Li Y, Li Y, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress mediates the ameliorative effect of apelin on vascular calcification[J]. J Mol Cell Cardiol, 2021, 152: 17-28

[18] de Oliveira Sá MPB, Cavalcanti LRP, Perazzo ÁM, et al. Calcific aortic valve stenosis and atherosclerotic calcification [J]. Curr Atheroscler Rep, 2020, 22(2): 2

[19] Herrmann J, Babic M, Tölle M, et al. Research models for studying vascular calcification[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2204

[20] Yuan C, Ni L, Zhang C, et al. Vascular calcification: New insights into endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2021, 134: 104105

[21] 韩建芳, 李丽华, 王宁宁, 等. 维持性血液透析患者慢性肾脏病矿物质和骨异常患病情况调查及血管钙化的危险因素分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(5): 953-956, 965

[22] Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2685

[23] Chen Y, Zhang LS, Ren JL, et al. Intermedin1-53 attenuates aging-associated vascular calcification in rats by upregulating sirtuin 1[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(7): 5651-5674

[24] Chang JR, Duan XH, Zhang BH, et al. Intermedin1-53 attenuates vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress via cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A pathway[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 238(10): 1136-1146

[25] 曾蓉, 李安琪, 刘江华. 血管平滑肌细胞内质网应激与血管钙化的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(11): 949-954

[26] Li W, Shang F, Li X, et al. Blocking PERK resuces vascular smooth muscle cells from homocysteine-induced ER stress and apoptosis[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2020, 25(3): 536-548

[27] 黄家喜, 李晶, 鲍翠玉. 和厚朴酚对高脂所致心肌细胞氧化应激损伤的保护作用及其与内质网应激 - 线粒体凋亡通路的相关性[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 809-814

[28] Rezghi Barez S, Movahedian Attar A, Aghaei M. MicroRNA-30c-2-3p regulates ER stress and induces apoptosis in ovarian cancer cells underlying ER stress[J]. EXCLI J, 2021, 20(5): 922-934

[29] Li L, Zheng G, Cao C, et al. The ameliorative effect of berberine on vascular calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(2): 294-304

[30] 邓丹芳, 孙龙, 林腊梅, 等. 肾元颗粒通过线粒体介导平滑肌细胞凋亡对糖尿病肾病模型小鼠血管钙化的改善作用[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2641-2646