

文章编号: 1001-6325(2023)08-1234-07

研究论文

高钙磷激活 DNA 损伤应答诱导人主动脉平滑肌细胞早衰

范志娟, 武玉晶, 田亚琼, 刘爽, 张蝶, 刘树业*

天津市第三中心医院 检验科 天津市重症疾病体外生命支持重点实验室 天津市人工细胞工程技术研究中心
天津市肝胆疾病研究所, 天津 300170

摘要:目的 探讨 DNA 损伤应答(DDR)通路调控人主动脉平滑肌细胞(HASMCs)钙化机制。方法 将 HASMCs 分为对照组、模型组、ATM 干预组、PARP 干预组,培养 12 d。茜素红-S 染色法定性和邻-甲酚酞法定量检测细胞钙化; Western blot 检测组蛋白 γ H2AX 磷酸化、p16 和 p21、ATM 上 Ser1981 的磷酸化水平; β -半乳糖苷酶染色检测细胞早衰;qPCR 检测 p16 和 p21 mRNA 水平。8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG)检测氧化应激水平,ELISA 方法检测 IL-6、IL-8 水平。结果 模型组较对照组钙化明显,8-OHdG、组蛋白 γ H2AX 磷酸化、 β -半乳糖苷酶染色、p16 的 mRNA 和蛋白、p21 mRNA、IL6 和 IL8、ATM 磷酸化等指标有显著变化($P < 0.05$), ATM 和 PARP 干预组可以缓解模型组的变化。结论 高钙磷环境刺激 HASMCs 产生持续 DNA 损伤,触发 ATM 磷酸化并激活 p16 蛋白表达,诱导细胞早衰导致钙化。

关键词: Ca^{2+}/P ; DNA 损伤应答; 细胞早衰; 人主动脉平滑肌细胞; 血管钙化

中图分类号: R543.5 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.08.1234

DNA damage response activated by high calcium and phosphorus induces premature aging of human aortic smooth muscle cells

FAN Zhijuan, WU Yujing, TIAN Yaqiong, LIU Shuang, ZHANG Die, LIU Shuye*

Department of Clinical Laboratory, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin Key Laboratory of Extracorporeal Life Support for Critical Diseases, Artificial Cell Engineering Technology Research Center, Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease, Tianjin 300170, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of DNA damage response(DDR) pathway regulating calcification in human aortic smooth muscle cells(HASMCs). **Methods** The HASMCs were divided into the control group, model group, ATM treatment group, and PARP treatment group, and they were cultured for 12 days. Cell calcification was measured by Alizarin red staining and σ -Cresolphthalein; phosphorylation levels of histone γ H2AX, protein levels of p16 and p21, and phosphorylation levels of ATM on Ser1981 were tested by Western blot, premature cell senescence by β -galactosidase staining; and p16 and p21 mRNA by qPCR. The level of oxidative stress was measured by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG), and the level of IL-6 and IL-8 was measured by ELISA kit.

收稿日期: 2022-11-14 修回日期: 2023-03-29

基金项目: 天津市医学重点学科(TJYXZDXK-047A); 天津市卫生健康委科技基金(KJ20151)

* 通信作者(corresponding author): lshye@163.com

Results The calcification was evident in the model group as compared with that in control group. There were significant changes in 8-OHdG, histone γ H2AX phosphorylation, β -galactosidase staining, mRNA and protein of p16, p21 mRNA, release of IL 6 and IL 8 and ATM phosphorylation ($P < 0.05$). The changes in the model group alleviated by ATM and PARP treatment. **Conclusions** High calcium and phosphorus environment stimulates HASMCs to produce sustained DNA damage, triggers ATM phosphorylation, activates p16 protein expression, and induces premature cell senescence causing cell death and resulted in calcification.

Key words: Ca^{2+}/P ; DNA damage response (DDR); cellular senescence; human aortic smooth muscle cells (HASMCs); vascular calcification

心血管并发症是慢性肾病患者 (chronic kidney disease, CKD) 常见并发症和首要死亡原因。CKD 患者钙磷代谢紊乱引起血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的 DNA 损伤^[1]。VSMC 由于受伤而死亡成为钙化灶, 诱导血管钙化^[2]。而钙磷失衡导致的动脉血管钙化是 CKD 患者并发心血管疾病的主要原因。动脉血管钙化与 VSMC 的早衰关系密切^[3]。

近年来, 多项研究发现 DNA 损伤应答 (DNA damage response, DDR) 在血管早衰病理中发挥关键作用^[4-5]。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来维持基因组稳定性^[5]。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 kinase, ATM) 和多聚 (ADP-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^[6-7]。然而到目前为止, 尚无数据完全阐明 DDR 信号通路在 CKD 患者血管平滑肌细胞钙化中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:

人主动脉平滑肌细胞系 (HASMCs) (ScienCell 公司)、M199 培养基 (Thermo Fisher 公司)、ATM 抑制剂 KU55933, PARP 抑制剂 PJ34 (Abcam 公司)。茜素红 S 染色液 (碧云天生物科技有限公司)、钙离子定量检测试剂盒 (邻-甲酚酞法)、磷酸化组蛋白 H2AX 抗体、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒; ATM、p-ATM (Ser1981)、p21 (Cell signalling 公司); p16、 β -actin (Sigma 公司), 8-羟基-2'-脱氧鸟苷 (8-OHdG) ELISA 试剂盒, IL-6 ELISA 检测试剂

盒、IL-8 ELISA 检测试剂盒均购自上海赛培森生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理: 将 HASMCs 分为对照组 (control, $\text{Ca}: 1.8 \text{ mmol/L}$; $\text{P}: 1.0 \text{ mmol/L}$), 模型组 (model, $\text{Ca}: 2.7 \text{ mmol/L} + \text{P}: 2.5 \text{ mmol/L}$), ATM 干预组 (iATM 组, KU55933: $10 \mu\text{mol/L} + \text{Ca}: 2.7 \text{ mmol/L} + \text{P}: 2.5 \text{ mmol/L}$), PARP 干预组 (iPARP 组, PJ34: $10 \mu\text{mol/L} + \text{Ca}: 2.7 \text{ mmol/L} + \text{P}: 2.5 \text{ mmol/L}$), 每 3 d 换液一次, 连续培养 12 d, 用光学显微镜观察细胞钙化情况。

1.2.2 HASMCs 钙化程度的测定:

1.2.2.1 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。

1.2.2.2 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°C 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。剩余细胞提取细胞总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒法测定蛋白含量。用蛋白含量校正钙含量 (mmol/g)。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达: 样品裂解、超声、离心后用 BCA 测蛋白浓度, 预制胶上样 (平均 $20 \mu\text{g}$ 蛋白含量/孔); 电泳: 120 V , 90 min ; 转膜: 恒压 90 V 转膜 90 min ; 封闭 1 h; 孵育一抗 4°C 过夜; 孵育二抗室温避光孵育 1.5 h; 显色: TBST 洗膜 $3 \times 15 \text{ min}$ 后, 使用 Odyssey 双通道荧光成像仪避光扫描, 保存结果。

1.2.4 氧化应激损伤的检测 使用 8-羟基-2'-脱氧鸟苷 (8-OHdG) ELISA 试剂盒 (ab201734) 检测内源性 & 外源性因素 DNA 氧化应激损伤, 根据试剂

盒说明书操作。

1.2.5 β -半乳糖苷酶染色检测细胞早衰,根据试剂说明书操作

1.2.6 ELISA 方法检测 IL-6、IL-8 水平,根据试剂说明书操作

1.2.7 qPCR 检测 mRNA:基因定量表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。qPCR 引物见表 1。

1.3 统计学分析

采用 SPSS24.0 软件对数据进行处理。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间作 t 检验分析,多组间采用单因素方差分析,计数资料以百分数表示,比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 模型组细胞钙化显著

与对照组相比,模型组培养至第 9 天开始发现钙化沉积,培养至第 12 天钙化灶显著(图 1)。

2.2 模型组中组蛋白 γ H2AX 磷酸化水平升高

培养至第 12 天,模型组中 DNA 损伤标志物组蛋白 γ H2AX 磷酸化(histone H2AX at serine 139, γ H2AX)水平高于对照组($P<0.01$)(图 2)。

2.3 模型组 8-OHdG 水平升高

生长 12 d 时,模型组和对照组 8-OHdG 水平分别为($1\ 238.02\pm 208.34$) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和(625.01 ± 89.24) $\mu\text{g}/\text{mL}$,模型组氧化应激水平高于对照组($P<0.05$)。

2.4 模型组细胞衰老检测

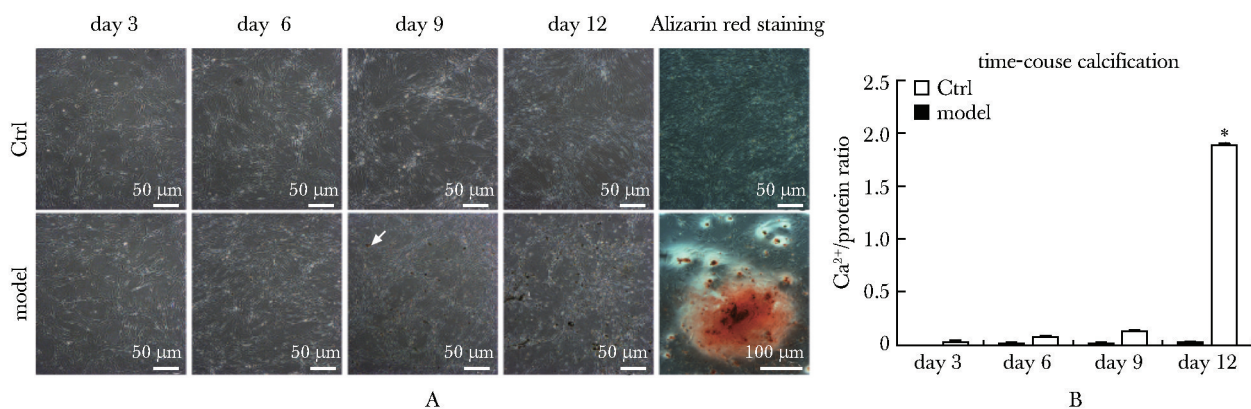
2.4.1 模型组中 β -半乳糖苷酶染色阳性率高,可被 iATM 抑制。

与对照组相比,模型组的细胞在第 12 天时 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性百分率更高(图 3)。ATM 干预组中 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性百分率与对照组基本一致。而 PARP 干预组中 β -Gal 阳性染色的百分比显著升高。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequences

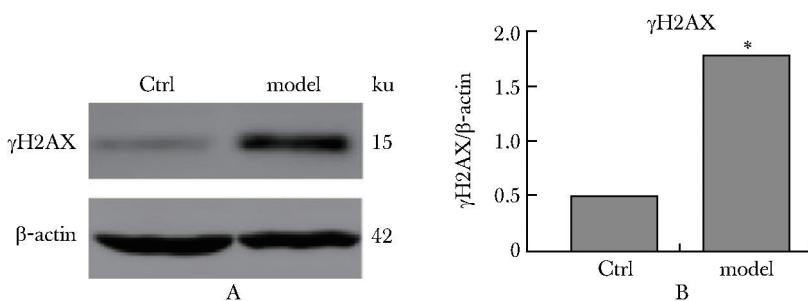
gene	primer sequence(5'-3')
GAPDH	F:CGACCACTTTGTCAAGCTC; R:CAAGGGGTCTACATGGCAAC
p21	F:CAGAGGAGCGCCAAGACAG;R: CCTGACGGCGGAAAAACGG
p16	F:CAACGCACCGAATAGTTACG; R:CAGCTCCTCAGCCAGTGC



A. corresponding four time-point images of HASMCs captured under light microscope to show calcification status, indicated by brown patches (white arrows); Alizarin red staining was also carried out at day 12 of calcification induction; B. the σ -cresolphthalein assay was used to measure the amount of calcification at corresponding four time-point ($n=9$); $*P<0.01$ compared with control.

图 1 高钙磷培养基诱导细胞钙化

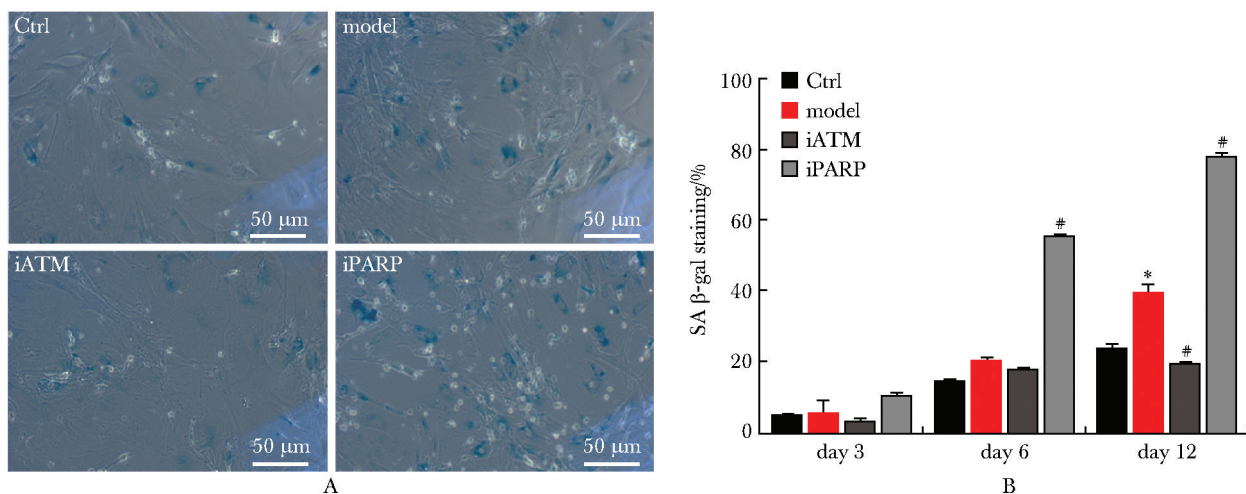
Fig 1 Culture of HASMCs in high Ca^{2+}/P medium induced cell calcification



A, B. Western blot for changes in γ H2AX protein levels in HASMCs grown with or without high Ca^{2+}/P harvested at day 12; * $P < 0.01$ compared with control.

图2 在钙化过程中观察到组蛋白 γ H2AX 磷酸化

Fig 2 Histone H2AX phosphorylation was observed in calcification ($n = 3$)



A. representative images of cells harvested on day 12 for SA β -Gal staining at pH 6.0, $n = 3$; B. significant differences with respect to the corresponding day of the cells in model group are shown; * $P < 0.05$ compared with control, # $P < 0.01$ compared with model.

图3 SA β -gal 染色发现钙化过程中的早衰现象

Fig 3 Senescence in calcification was detected by SA β -Gal Staining

2.4.2 模型组中 p16 的 mRNA 水平和蛋白水平升高, p21 的 mRNA 水平升高。iATM 降低了 p16 mRNA 和蛋白表达, iPARP 仅降低了 p16 和 p21 的 mRNA 表达(图 4,5)。

第 12 天时,与对照组相比,模型组细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p16 和 p21 的 mRNA 水平升高。ATM 干预组显著降低了 p16 的 mRNA 水平。PARP 干预组显著降低了 p16 和 p21 的 mRNA 水平(图 4)。与对照组相比,模型组 p16 的蛋白水平有升高趋势,并且 ATM 抑制显著降低了其表达(图 5A 和 B)。然而,对照组、模型组、干预组中 p21 的水平保持不变(图 5A 和 C)。

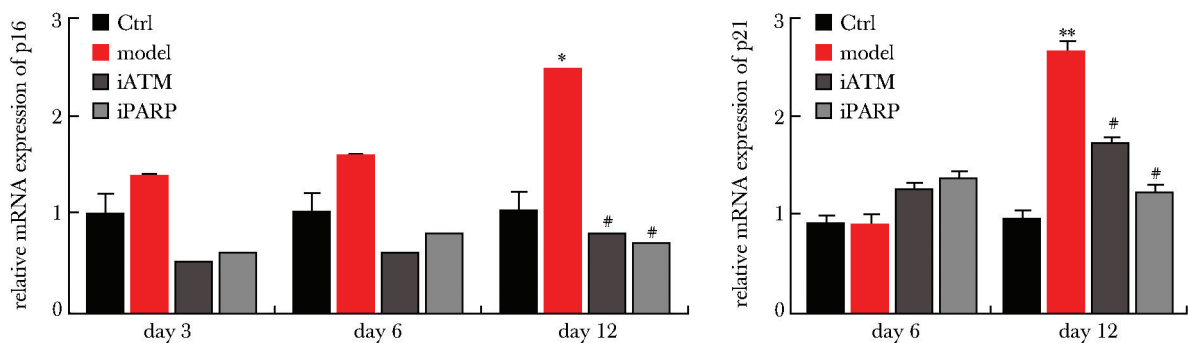
2.4.3 模型组中 IL6 和 IL8 的表达显著增加,该表

达均可被 iATM、iPARP 抑制。

对照组、模型组、ATM 抑制组、PARP 抑制组中 IL6 和 IL8 随时间增加,分泌逐渐增强,但模型组增加最明显(图 6)。第 12 天时, iATM 和 iPARP 都能够明显阻断衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)因子 IL6 和 IL8。与 iATM 相比 iPARP 抑制剂可更有效地阻断 SASP 因子的分泌。

2.5 模型组中 ATM 磷酸化水平高,可被 iATM 和 iPARP 抑制

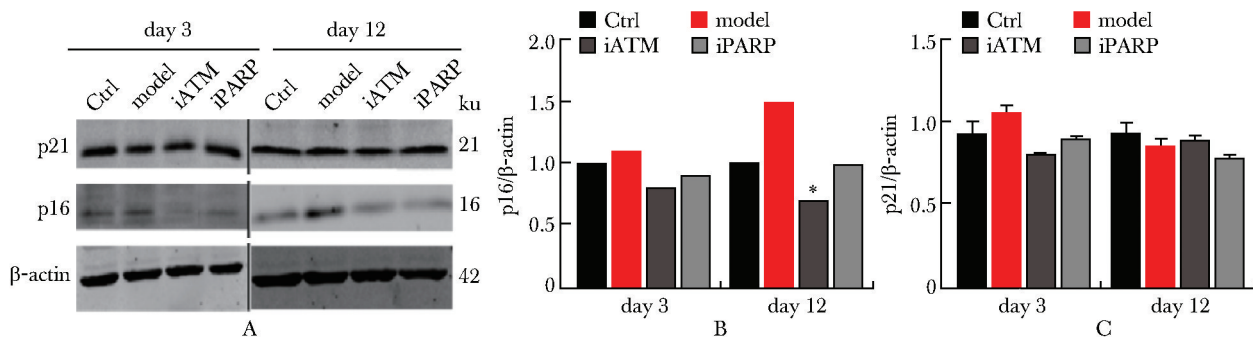
在第 12 天,与对照组相比,模型组细胞 Ser1981 上 ATM 的自磷酸化达到最高水平,其磷酸化的 ATM 是对照组细胞的 3 倍。用 iATM 和 iPARP 处理



High Ca^{2+}/P in culture medium was used to induce calcification of HASMCs; these cells were also cultured in the absence or presence of DDR inhibitors (iATM, 10 μm KU55933; iPARP, 10 μm PJ34); at day 12, calcification was only observed in model group that were grown without DDR inhibitors; gene expression (mRNA) of senescence markers (p16 and p21) was quantified with real-time PCR and was normalized to GAPDH; $n=3$ or 4; * $P<0.05$ compared with control, # $P<0.01$ compared with model.

图4 ATM和PARP对HASMCs细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂表达的影响

Fig 4 The effects of ATM and PARP inhibition on the mRNA expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in HASMCs



High Ca^{2+}/P in culture medium was used to induce calcification. HASMCs were also cultured in the absence and presence of DDR inhibitors (iATM, 10 μm KU55933; iPARP, 10 μm PJ34); at day 12, calcification was only observed in model group without inhibitors; A. representative images of p21, p16 and β -actin protein levels detected by Western blot on day 3 and day 12; B. quantification of p16/ β -actin and p21/ β -actin protein level ratios; significant differences with respect to the corresponding day of the cells in model group are shown; * $P<0.05$ compared with control.

图5 高 Ca^{2+}/P 诱导下的细胞增殖停滞通路

Fig 5 Pathway regulating cell growth arrest in response to high Ca^{2+}/P ($n=3$)

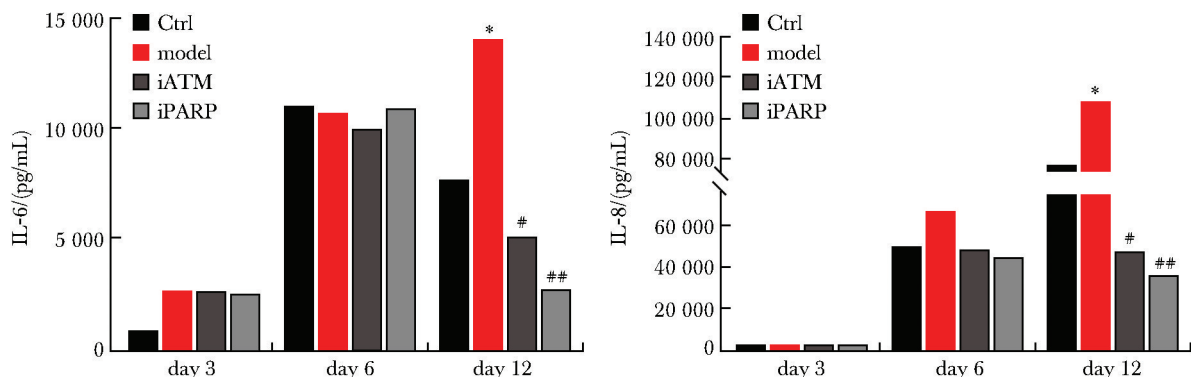
理细胞可抑制 ATM 磷酸化现象。在钙化刺激后, DDR 信号被启动,从第 3 天开始,模型组中 ATM 出现 Ser1981 自磷酸化,提示 DDR 信号启动。ATM 的激活与另一个 DSB 标志物 γH2AX 一样,在钙化过程中可以早期检测到(图 7)。

3 讨论

CKD 患者因矿物质代谢紊乱引起血管钙化,导致心血管死亡率增加。在牛主动脉平滑肌细胞的体外钙化模型中,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^[8]。本研究发现高钙磷刺激至第 12 天,茜素红 S 染色和 σ -甲酚酞检测发现钙化灶;组蛋白 H2AX 的磷酸化和 γH2AX 灶提示存在 DNA 损伤;8-羟基-2'-脱氧鸟苷检测发现 DNA 损伤由氧化应激引起;SA- β -Gal 染色阳性、早衰标志物 (p16 和 p21) 和 SASP 标志物 (IL-6 和 IL-8)、细胞周期停滞标志物 (p16 和 p21) 检测发现细胞存在早衰现象。ATM 的 Ser1981 自磷酸水平升高,提示 DDR 信号途径被激活。

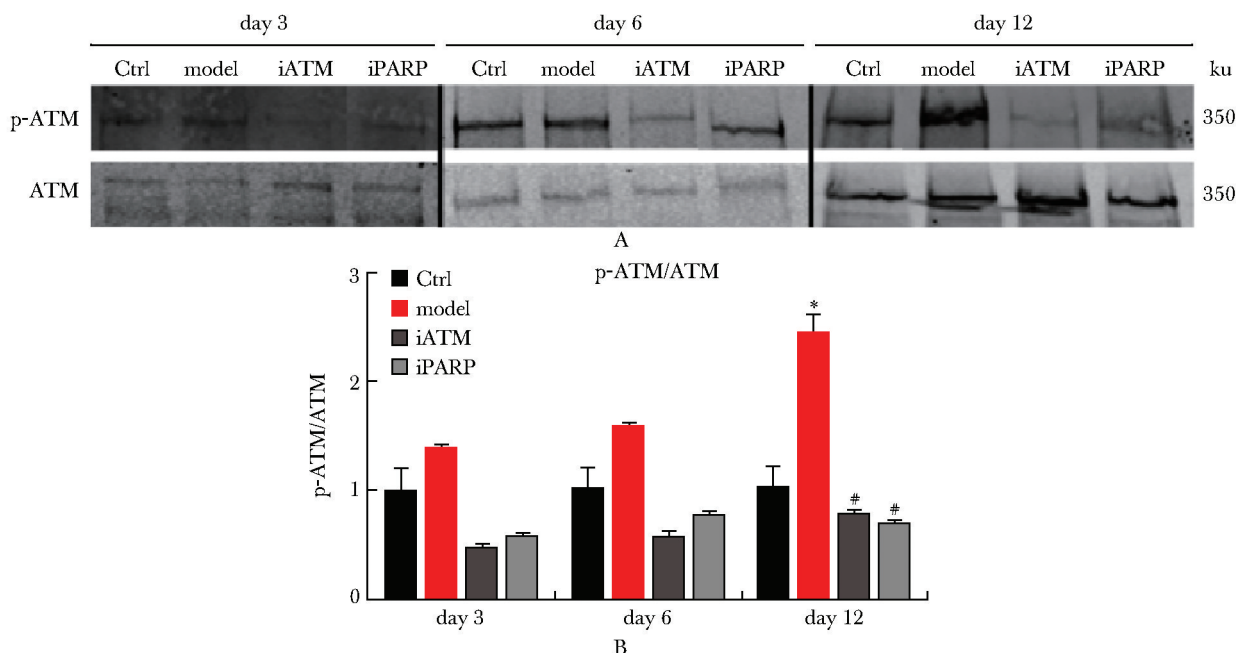
ATM 和 PARP 都是 DDR 信号级联反应中的关



High Ca^{2+}/P in culture medium was used to induce calcification; HASMCs were also cultured in the absence and presence of DDR inhibitors (iATM, 10 μm KU55933; iPARP, 10 μm PJ34); at day 12, calcification was only observed in Model group without inhibitors; gene expression (mRNA) of SASP markers (IL-6, IL-8) was quantified with real-time PCR and was normalized to GAPDH; * $P < 0.05$ compared with control, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$ compared with model.

图 6 ATM 和 PARP 抑制对 SASP 因子的影响

Fig 6 The effects of ATM and PARP inhibition on the SASP factors ($n=3$)



High Ca^{2+}/P in culture medium was used to induce calcification; HASMCs were also cultured in the absence and presence of DDR inhibitors (iATM, 10 μm KU55933; iPARP, 10 μm PJ34); at day 12, calcification was only observed in model group without inhibitors; A. representative images of p-ATM and ATM protein levels detected by Western blot on day 3, 6 and 12; B. quantification of p-ATM/ATM protein level ratio; significant differences with respect to the corresponding day of the cells in model group were shown; * $P < 0.01$ compared with control, # $P < 0.001$ compared with model.

图 7 DNA 持续的 DNA 损伤信号调节衰老

Fig 7 Persistent DNA damage signaling regulates senescence ($n=3$)

键靶点^[9]。数据显示 ATM 干预组和 PARP 干预组都能够抑制高钙磷诱导的钙化,阻止钙化偶联的细胞死亡,抑制细胞发生早衰现象。虽然 iPARP 对

SA- β -半乳糖苷酶的表达没有影响,但 iPARP 有效地阻止了其他早衰相关的标志物 (p16 和 p21, IL-6 和 IL-8),其原因可能与 SA- β 半乳糖苷酶的活性主

要与自噬过程中溶酶体活性的增加直接相关^[10]。

抑制 ATM 和 PARP 途径可以减低 IL-6 和 IL-8 的表达,说明 DDR 途径在建立和维持 SASP 中很重要。在获得早衰和 SASP 之前,高 Ca²⁺/P 在 HASMCs 内诱导持续的 DNA 损伤应答,可能通过 DDR 介导的细胞外信号进一步影响未受损的邻近细胞^[11],形成正反馈回路。

ATM 干预组显著降低了 p16 的 mRNA 和蛋白水平。PARP 干预组虽然显著降低了 p16 和 p21 的 mRNA 水平,但是在蛋白水平上变化没有统计学意义。综合 ATM、PARP 在早衰标志物和 ATM 自磷酸化的数据发现 DDR 信号主要通过 p16 途径对高钙

磷诱导的钙化起作用。这个结论与 ERCC1 缺陷小鼠中清除 p16 阳性的早衰细胞的研究结果一致^[12-13]。在 BubR1 早衰小鼠研究中,用 INK-ATTAC 方法清除 p16 阳性的早衰细胞,延迟了脂肪组织、骨骼肌和眼睛的早衰表型的出现,却没有在心血管系统中出现^[14]。然而,在非老年性小鼠中,同样的方法却降低了心脏的压力敏感性^[13]。

综上,高水平的钙盐和磷酸盐产生更多的氧化应激,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 损伤应答途径诱导细胞早衰,导致钙化。具体机制需进一步研究。

参考文献:

- [1] Priante G, Mezzabotta F, Cristofaro R, *et al.* Cell death in ectopic calcification of the kidney[J]. *Cell Death Dis*, 2019,10:466. doi:10.1038/s41419-019-1697-8.
- [2] Dithabanchong S, Srisuwarn P. Mechanisms of vascular calcification in kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2019,2:417-426.
- [3] Dhakshinamoorthy J, Elumalai RP, Dev B, *et al.* Assessment of abdominal aortic calcification in predialysis chronic kidney disease and maintenance hemodialysis patients [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2017, 28: 1338-1348.
- [4] Castagna A, Gareri P, Falvo F, *et al.* Werner syndrome: a rare mutation [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2019, 31: 425-429.
- [5] Zhao Z, Dong Q, Liu X, *et al.* Dynamic transcriptome profiling in DNA damage-induced cellular senescence and transient cell-cycle arrest [J]. *Genomics*, 2020, 112: 1309-1317.
- [6] Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response[J]. *Mol Cell*, 2017,66:801-817.
- [7] Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic[J].*Science*, 2017,355:1152-1158.
- [8] 刘立新, 王士雯, 丁秀云, 等. 牛主动脉平滑肌细胞体外钙化模型的制备[J]. *基础医学与临床*, 2006, 16: 1138-1141.
- [9] Cuella-Martin R, Hayward SB, Fan X, *et al.* Functional interrogation of DNA damage response variants with base editing screens[J].*Cell*, 2021,184:1081-1097.e19. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.041.
- [10] Young AR, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22: 234-240.
- [11] Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, *et al.* DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment[J].*Front Genet*, 2015,6:94. doi: 10.3389/fgene.2015.00094.
- [12] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J].*Nature*, 2011,479:232-236.
- [13] Baker DJ, Childs BG, Durik M, *et al.* Naturally occurring p16 (Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan[J].*Nature*, 2016,530:184-189.
- [14] Shah AV, Bennett MR. DNA damage-dependent mechanisms of ageing and disease in the macro- and microvasculature[J].*Eur J Pharmacol*, 2017,816:116-128.