

Bax 抑制因子 1 通过促进视神经萎缩蛋白 1 表达抑制小鼠动脉血管钙化

陈韦任^{1,2}, 杜辉², 钱赓³, 周玉杰¹, 陈韵岱³, 马茜¹, 吴雪萍², 沙媛²

¹首都医科大学附属北京安贞医院心内 12 病房, 北京市心肺血管疾病研究所, 冠心病精准治疗北京市重点实验室, 首都医科大学冠心病临床诊疗与研究中心, 北京 100029; ²中国人民解放军总医院第二医学中心心血管内科, 国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100853; ³中国人民解放军总医院第一医学中心心血管内科, 北京 100853

摘要:目的 探讨 Bax 抑制因子 1 (BI-1) 和视神经萎缩蛋白 1 (OPA1) 蛋白对血管钙化的影响。方法 ApoE^{-/-}糖尿病小鼠高脂喂养 12 周后予以腹腔注射 N^ε-(1-羧甲基)-L-赖氨酸 16 周建立血管钙化模型, 实验将小鼠分为 4 组, 6 只/组: 对照组 (ApoE^{-/-}小鼠普通饲料喂养)、钙化组 (ApoE^{-/-}小鼠建立钙化模型)、钙化+BI-1^{TG}组 (血管特异性过表达 BI-1 的 ApoE^{-/-}小鼠建立钙化模型) 和钙化+BI-1^{TG}+OPA1^{-/-}组 (血管特异性过表达 BI-1 和基因敲除 OPA1 的 ApoE^{-/-}小鼠建立钙化模型)。另 β 磷酸甘油诱导血管平滑肌细胞建立细胞钙化模型。使用 von Kossa 染色检测血管钙化程度, 使用 ELISA 检测主动脉钙含量, 使用免疫组织化学方法检测 Runt 相关转录因子 2 和骨形态发生蛋白 2 表达, 使用 TUNEL 检测细胞凋亡率, 使用 Western blot 检测 BI-1、OPA1、Runt 相关转录因子 2、骨形态发生蛋白 2 和活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 水平的表达。结果 血管钙化后, BI-1 和 OPA1 蛋白表达均下降 ($P=0.0044$), 钙沉积、Runt 相关转录因子 2、骨形态发生蛋白 2 及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达增加 ($P=0.0041$)。过表达 BI-1 促进 OPA1 蛋白表达, 钙沉积、Runt 相关转录因子 2、骨形态发生蛋白 2 及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达均减少 ($P=0.0006$)。基因敲除 OPA1 蛋白后, 钙沉积、Runt 相关转录因子 2、骨形态发生蛋白 2 及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 又明显增多 ($P=0.0007$)。结论 BI-1 可能通过促进 OPA1 表达, 减轻钙沉积、细胞骨型分化和细胞凋亡, 继而抑制血管钙化。

关键词: Bax 抑制因子 1; 视神经萎缩蛋白 1; 血管钙化; 细胞骨型分化; 细胞凋亡

Bax inhibitor 1 inhibits vascular calcification in mice by activating optic atrophy 1 expression

CHEN Weiren^{1,2}, DU Hui², QIAN Geng³, ZHOU Yujie¹, CHEN Yundai³, MA Qian¹, WU Xueping², SHA Yuan²

¹Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital of Capital Medical University, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Disease, Beijing 100029, China; ²Department of Cardiology, Second Medical Center and National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Department of Cardiology, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Bax inhibitor 1 (BI-1) and optic atrophy protein 1 (OPA1) on vascular calcification (VC). **Methods** Mouse models of VC were established in ApoE-deficient (ApoE^{-/-}) diabetic mice by high-fat diet feeding for 12 weeks followed by intraperitoneal injections with N^ε-carboxymethyl-lysine for 16 weeks. ApoE^{-/-} mice (control group), ApoE^{-/-} diabetic mice (VC group), ApoE^{-/-} diabetic mice with BI-1 overexpression (VC+BI-1^{TG} group), and ApoE^{-/-} diabetic mice with BI-1 overexpression and OPA1 knockout (VC+BI-1^{TG}+OPA1^{-/-} group) were obtained for examination of the degree of aortic calcification using von Kossa staining. The changes in calcium content in the aorta were analyzed using ELISA. The expressions of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) were detected using immunohistochemistry, and the expression of cleaved caspase-3 was determined using Western blotting. Cultured mouse aortic smooth muscle cells were treated with 10 mmol/L β-glycerophosphate for 14 days to induce calcification, and the changes in BI-1 and OPA1 protein expressions were examined using Western blotting and cell apoptosis was detected using TUNEL staining. **Results** ApoE^{-/-} mice with VC showed significantly decreased expressions of BI-1 and OPA1 proteins in the aorta ($P=0.0044$) with obviously increased calcium deposition and expressions of RUNX2, BMP-2 and cleaved caspase-3 ($P=0.0041$). Overexpression of BI-1 significantly promoted OPA1 protein expression and reduced calcium deposition and expressions of RUNX2, BMP-2 and cleaved caspase-3 ($P=0.0006$). OPA1 knockdown significantly increased calcium deposition and expressions of RUNX2, BMP-2 and cleaved caspase-3 in the aorta ($P=0.0007$). **Conclusion** BI-1 inhibits VC possibly by promoting the expression of OPA1, reducing calcium deposition and inhibiting osteogenic differentiation and apoptosis of the vascular smooth muscle cells.

Keywords: Bax inhibitor 1; optic atrophy protein 1; vascular calcification; osteogenic differentiation; apoptosis

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 国家重点研发计划“精准医学研究”重点专项 (2017YFC0908800); 北京市医院管理局“使命”计划专项经费资助 (SML20180601); 首都卫生发展科研专项 (首发 2020-2-2063); 北京市教育委员会科技计划 (KM200910025012); 北京市自然科学基金 (7202041); 北京市博士后资助项目 (202011)

作者简介: 陈韦任, 博士, 副主任医师, E-mail: chen_weiren@sina.com; 杜辉, 副主任护师, E-mail: hdu301@126.com。陈韦任、杜辉共同为第一作者

通信作者: 周玉杰, 博士, 主任医师, 教授, E-mail: azyj12@163.com; 钱赓, 博士, 副主任医师, 副教授, E-mail: qiangeng9396@263.net

Bax 抑制因子 1 (BI-1) 是重要的细胞凋亡抑制因子^[1,2]。本课题组前期研究发现 BI-1 与血管钙化密切相关, 血管钙化中, BI-1 蛋白表达下降, 细胞钙含量、碱性磷酸酶活性、Runt 相关转录因子 2 (Runx-2)、细胞凋亡增加; 过表达 BI-1 蛋白后细胞钙含量、碱性磷酸酶活性、Runx-2、细胞凋亡减少, 血管钙化减轻^[3]。但 BI-1 通路的下游调控蛋白并未清楚。视神经萎缩蛋白 1 (OPA1) 作为介导线粒体内膜融合的主要因子, 在维持线粒体结构和功能稳态中发挥重要作用^[4-6]。前期研究结果显示血管钙化下调 OPA1 蛋白表达, 线粒体融合减少, 线粒体损伤增加, 钙沉积、Runx-2 蛋白表达、细胞凋亡率增加, 而过表达 OPA1 能促进线粒体融合, 抑制钙沉积、细胞骨型分化和凋亡, 减轻血管钙化^[7]。

BI-1 是线粒体形态和功能的重要调节蛋白^[8-10]。BI-1 能调控心肌微血管内皮细胞线粒体融合—分裂, 保护线粒体结构和功能, 减少氧化应激损伤和细胞凋亡^[11]。在急性肾损伤中, 肾小管上皮细胞 BI-1 表达下调, 线粒体分裂增加; 上调 BI-1 表达后, 线粒体分裂减少, 氧化应激损伤和细胞凋亡减轻^[12]。但 BI-1 蛋白是否直接影响 OPA1 蛋白表达? BI-1 是否通过 OPA1 抑制钙沉积、细胞骨型分化和细胞凋亡, 进而减轻血管钙化, 这些问题尚未见研究。因此, 本研究构建小鼠血管钙化模型, 并探究 BI-1 如何通过调控 OPA1 蛋白影响血管钙化。

1 材料和方法

1.1 材料

ApoE^{-/-}小鼠、BI-1^{TG}; ApoE^{-/-}小鼠、BI-1^{TG}; OPA1^{-/-}; ApoE^{-/-}小鼠(北京赛业生物公司)。动物实验规程已获批准, 符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

HE 染色试剂盒(北京索莱宝公司); von Kossa 染色试剂盒(北京索莱宝公司); TUNEL 试剂盒(罗氏); 钙含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); BI-1、OPA1、Runx-2、骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 和 β -肌动蛋白(β -actin, Abcam)。SDS-PAGE 凝胶电泳仪(Bio-Rad)、光学显微镜(奥林巴斯)。

1.2 转基因小鼠的构建方法

构建血管平滑肌特异性蛋白 SM22 α 启动子与 BI-1 位点突变体真核表达质粒, 通过显微注射受精卵的方法制备目标小鼠, 经过 Western blot 法证明 BI-1 在小鼠血管平滑肌细胞特异性高表达。将 BI-1^{TG} 转基因小鼠与 ApoE^{-/-} 小鼠多次杂交并做基因鉴定之后, 得到基因型为 BI-1^{TG}; ApoE^{-/-} 小鼠用于试验。

将平滑肌特异性表达 Cre 酶的转基因雄性小鼠 (Tagln-cre) 与雌性 OPA1^{fllox/fllox} 小鼠交配, 通过繁殖筛选, 得到 Tagln-cre; OPA1^{fllox/fllox} 转基因小鼠, 并与 BI-1^{TG}; ApoE^{-/-} 小

鼠交配繁殖, 并筛选出 BI-1^{TG}; OPA1^{-/-}; ApoE^{-/-} 转基因小鼠, 通过 Western blot 鉴定 OPA1 敲低的程度与特异性。

1.3 小鼠钙化模型的建立和分组

8 周 ApoE^{-/-} 小鼠, 禁食不禁水 12 h 后, 于腹腔内注射链脲佐菌素 (50 mg/kg), 1 次/d, 连续 5 d。如连续 2 d 测量血糖 >250 mg/dL, 则认为糖尿病小鼠模型成功。高糖高脂饲料喂养 12 周后, 开始腹腔注射 N^ε-(1-羧甲基)-L-赖氨酸促进斑块钙化, 注射剂量为 60 μ g/次, 连续注射 16 周, 取其主动脉弓用于实验^[13]。实验分为 4 组 ($n=6$): Control 组 (ApoE^{-/-} 小鼠普通饲料喂养), VC 组 (ApoE^{-/-} 小鼠建立钙化模型), VC+BI-1^{TG} 组 (BI-1^{TG}; ApoE^{-/-} 小鼠建立钙化模型) 和 VC+BI-1^{TG}+OPA1^{-/-} 组 (BI-1^{TG}; OPA1^{-/-}; ApoE^{-/-} 小鼠建立钙化模型)。

1.4 小鼠主动脉血管平滑肌细胞培养和钙化模型的建立

无菌条件下取出 C57BL/6、BI-1^{TG} 或者 BI-1^{TG}; OPA1^{-/-} 小鼠主动脉, 剪成小组织块, 置于培养皿底部, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 等到细胞达到 80% 融合的时候即可传代用于试验。经 α -SMA 免疫组织化学染色鉴定纯度 $>95\%$ 。

血管平滑肌细胞长至融合状态后用于实验, 在常规培养基 (10% DME 细胞培养液) 中加入 10 mmol/L β 磷酸甘油 (β -GP) 和 7.2 mmol/L 氯化钙, 每隔 2 d 换 1 次液体, 连续培养 14 d, 建立血管平滑肌细胞钙化模型。

1.5 小鼠血清血脂、血糖检测

小鼠摘取眼球取血, 4 $^{\circ}$ C 下 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用 BECKMAN COULTER Au2700 全自动生物化学分析仪分析血糖、血甘油三酯、血胆固醇水平。

1.6 HE 染色和 von Kossa 染色

HE 染色: 小鼠主动脉弓经 4% 多聚甲醛固定后, 然后进行包埋、切片、脱蜡、脱水、HE 染色处理, 于普通光学显微镜下拍照记录。von Kossa 染色: 组织石蜡切片经脱蜡、脱水后, 置于硝酸盐溶液中照射 30 min 进行染色, 蒸馏水清洗 3 次后, 使用硫代硫酸钠溶液定影和中性品红复染, 蒸馏水再次冲洗后于显微镜下观察钙盐沉积情况, 使用 Image-Pro Plus 分析钙盐沉积面积百分比。

1.7 免疫组织化学染色检测 Runx-2 和 BMP-2 表达量

取组织石蜡切片, 柠檬酸缓冲液中修复后, BSA 封闭液封闭, 然后滴加一抗抗体 Runx-2 (1:300) 或 BMP-2 (1:300), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 蒸馏水冲洗 3 次, 然后滴加二抗抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 蒸馏水冲洗 3 次, 滴加 DAB 显色, 然后复染、脱水、封片, 在显微镜下观察并拍照。每张切片取 5 个高倍镜视野, 计算 Runx-2 或 BMP-2 阳性面积百分率。

1.8 主动脉组织钙含量的测定

取主动脉组织放入盐酸中过夜, 次日取上清液进行钙含量测定, 使用酶标仪检测吸光度, 计算出钙

含量(mg/g)。

1.9 TUNEL法检测血管平滑肌细胞凋亡情况

取血管平滑肌细胞建立钙化模型,使用多聚甲醛固定细胞,使用TUNEL试剂盒测定细胞凋亡,每样本中加入50 μL 标记液,常温下培养 60 min,然后加入辣根过氧化物培育 30 min,PBS 冲洗后,加入显色剂,细胞核染成棕色提示细胞凋亡,显微镜下计数并记录。

1.10 Western blot法检测主动脉组织BI-1、OPA1蛋白的表达水平

取主动脉组织制备匀浆,加入细胞裂解液裂解 30 min,BCA法检测蛋白浓度,经上样、电泳、电转、封闭后,加入一抗(BI-1 抗体、OPA1 抗体、Runx-2 抗体、BMP-2 抗体、活化的 caspase-3 抗体均按 1:1000 稀释) 4 °C 孵育过夜,洗膜后使用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)室温孵育 2 h。冲洗后,暗室曝光,扫描条带。

使用Image J软件分析灰度值,以β-actin为内参。

1.11 统计学方法

应用SPSS19.0软件进行统计学处理。计量资料用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较作独立样本t检验,计数资料以百分数表示,组间比较采用χ²检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量、血糖、血脂比较

与Control组比较,VC组、VC+BI-1^{TG}组和VC+BI-1^{TG}+OPA1^{-/-}组体质量、血糖、血胆固醇、血甘油三酯均升高(P<0.001)。与VC组比较,VC+BI-1^{TG}组和VC+BI-1^{TG}+OPA1^{-/-}组体质量、血糖、血胆固醇、血甘油三酯差异无统计学意义(P>0.05,表1)。

表1 小鼠体质量、血糖、血脂比较

Tab.1 Comparison of body weight, blood glucose, and plasma lipid levels among the 4 groups of mice (n=6)

Parameter	Control group	VC group	VC+BI-1 ^{TG}	VC+BI-1 ^{TG} +OPA1 ^{-/-}
Weight(g)	27.42±0.98	35.22±1.58*	34.27±1.27*	34.21±1.39*
Serum glucose (mmol/L)	5.58±0.52	23.54±1.09*	22.64±1.23*	22.93±1.44*
Blood cholesterol (mmol/L)	10.78±1.22	23.82±2.49*	22.13±2.17*	24.11±2.33*
Blood triglyceride (mmol/L)	1.58±0.10	2.65±0.11*	2.59±0.15*	2.61±0.13*

*P<0.05 vs control.

2.2 小鼠血管钙化后BI-1和OPA1的蛋白表达

小鼠血管钙化时,BI-1 和 OPA1 蛋白表达均下降,差异有统计学意义(P=0.0044)。而过表达BI-1 蛋白促进 OPA1 蛋白表达(P=0.0142,图1)。为进一步验证BI-1 和 OPA1 的相互作用关系,我们建立了血管平滑肌细胞钙化模型,结果显示β-GP 和氯化钙能降低血管平滑肌细胞BI-1 和 OPA1 蛋白,而上调BI-1 蛋白能增加 OPA1 蛋白表达(图2)。

2.3 BI-1/OPA1 蛋白通路对小鼠血管钙化钙沉积和斑块面积的影响

von Kossa 染色结果显示,血管钙化后钙盐沉积明显增多,过表达BI-1 蛋白后钙盐沉积减少(P=0.0006),沉默 OPA1 蛋白后钙盐沉积再次增加(P=0.0007,图3)。过表达BI-1 蛋白不仅能减少钙化面积,还能减少斑块面积,而沉默 OPA1 蛋白后斑块面积增多(P=0.0013,图4)。血管钙化后钙含量增加,过表达BI-1 蛋白能降低钙含量,而沉默 OPA1 蛋白后钙含量再次增高(P<0.001,图5)。

2.4 BI-1/OPA1 蛋白通路对小鼠血管钙化 Runx-2 和 BMP-2 表达的影响

免疫组织化学和 Western blot 结果显示,血管钙化

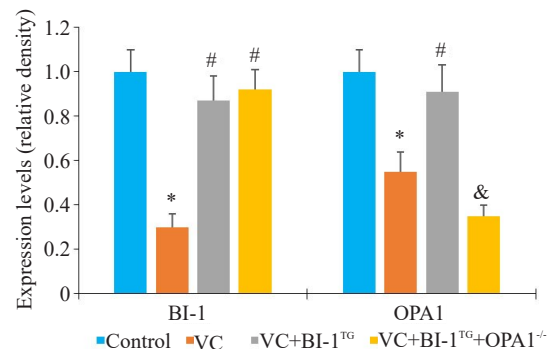
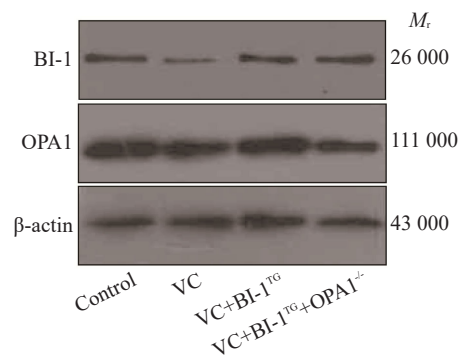


图1 Western blot测定血管钙化BI-1 蛋白和OPA1 蛋白表达
Fig.1 Protein expression levels of BI-1 and OPA1 in the 4 groups of mice (n=6). *P<0.01 vs control, #P<0.05 vs VC, &P<0.01 vs VC+BI-1^{TG}.

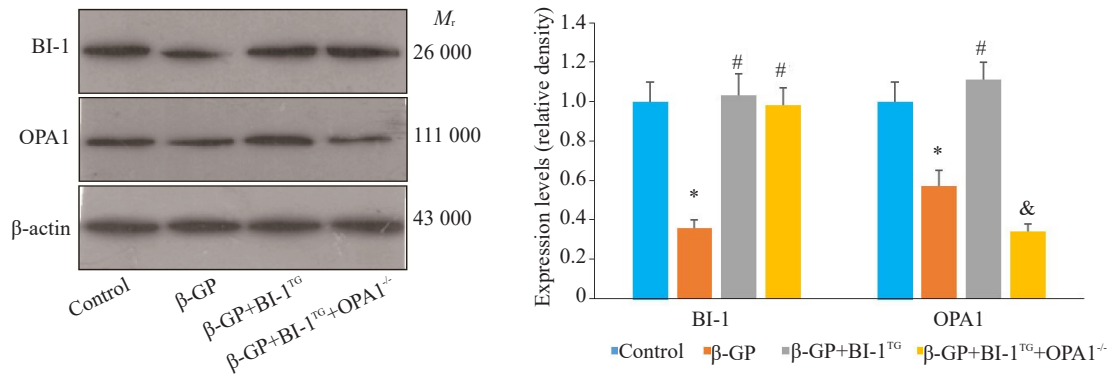


图2 Western blot测定血管平滑肌细胞钙化BI-1蛋白和OPA1蛋白表达

Fig.2 Protein expression levels of BI-1 and OPA1 in vascular smooth muscle cells with calcification (n=6).

*P<0.01 vs control, [#]P<0.01 vs β-GP, [&]P<0.01 vs β-GP+BI-1^{TG}.

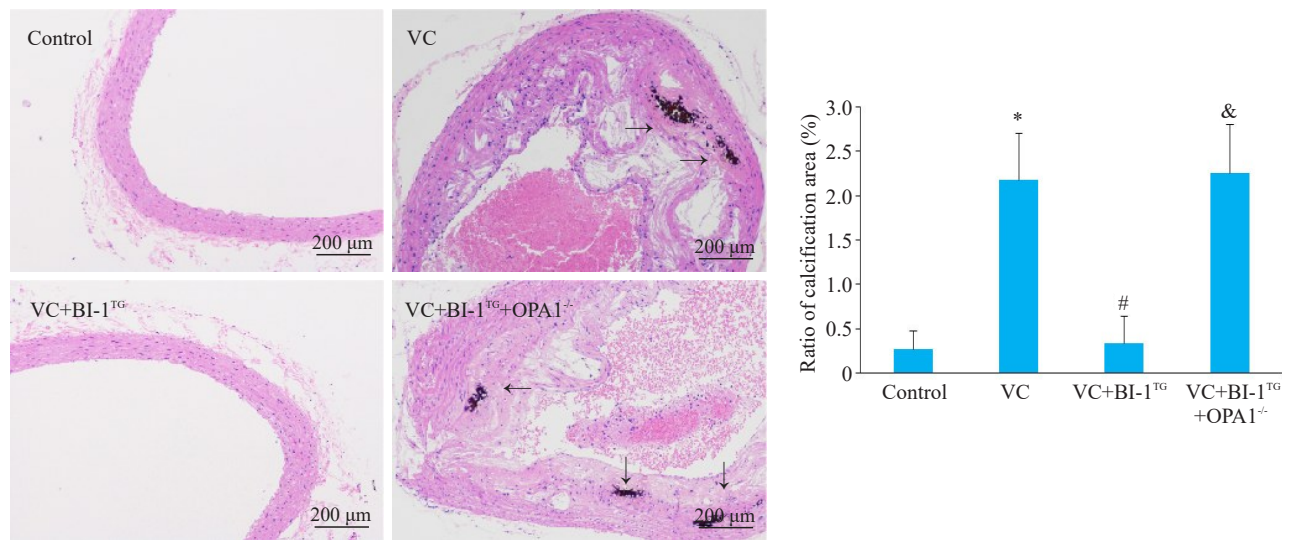


图3 von Kossa染色测定钙化面积

Fig.3 Calcification area in the aorta in different groups (n=6). The black nodules indicated by the arrows are the calcified nodules.

*P<0.01 vs control; [#]P<0.01 vs VC, [&]P<0.01 vs VC+BI-1^{TG}.

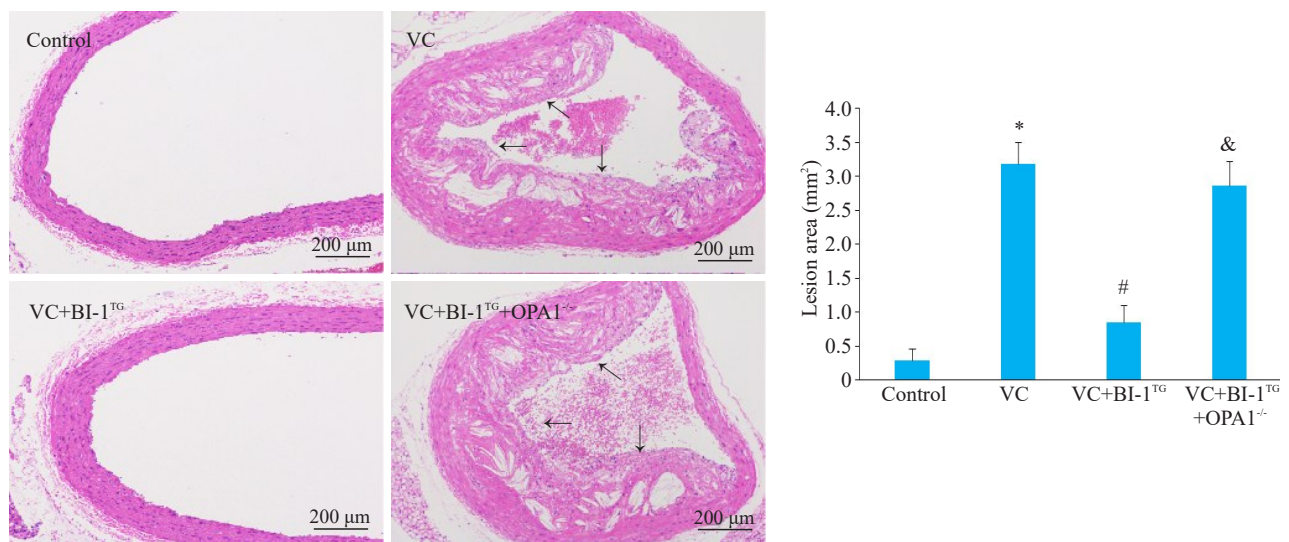


图4 HE染色测定斑块面积

Fig.4 Atherosclerotic lesions in different groups (n=6). Arrows indicate the atherosclerotic plaques. *P<0.01 vs control, [#]P<0.01 vs VC,

[&]P<0.01 vs VC+BI-1^{TG}.

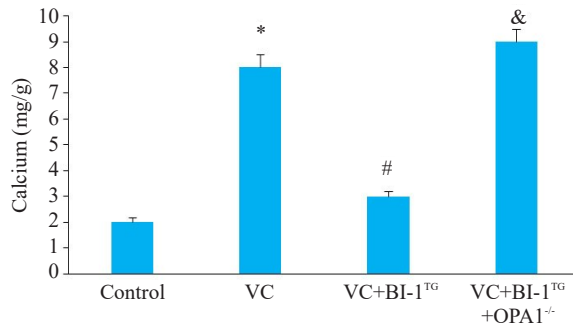


图5 各组主动脉组织钙含量测定
Fig.5 Calcium content in different groups (n=6). *P<0.01 vs control; #P<0.01 vs VC; &P<0.01 vs VC+BI-1^{Tg}.

后 Runx-2 和 BMP-2 表达增加, 过表达 BI-1 蛋白后 Runx-2 和 BMP-2 表达下降, 而沉默 OPA1 蛋白后 Runx-2 (P=0.0008) 和 BMP-2 表达恢复到钙化时水平 (P=0.0045, 图6~8)。

2.5 BI-1/OPA1 蛋白通路对小鼠血管钙化活化的 caspase-3 表达的影响

血管钙化后活化的 caspase-3 表达增加, 过表达 BI-1 蛋白后活化的 caspase-3 蛋白表达减少; 而沉默 OPA1 蛋白后活化的 caspase-3 蛋白表达再次增多 (P=0.0054, 图9)。为进一步证实 BI-1/OPA1 蛋白通路对细胞凋亡的作用, 我们建立了血管平滑肌细胞钙化模型, 结果显示过表达 BI-1 蛋白明显抑制血管平滑肌细胞凋亡, 而沉

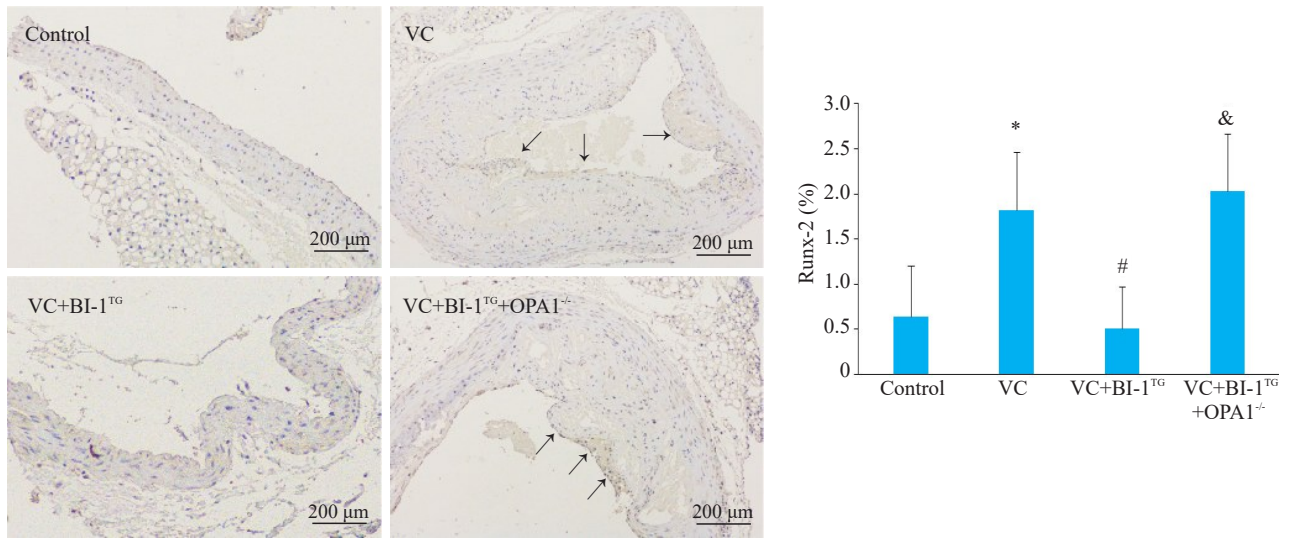


图6 免疫组织化学染色测定 Runx-2 表达
Fig.6 Expression levels of Runx-2 in different groups (n=6). The arrow indicates the Runx-2-positive area. *P<0.01 vs control; #P<0.01 vs VC; &P<0.01 vs VC+BI-1^{Tg}.

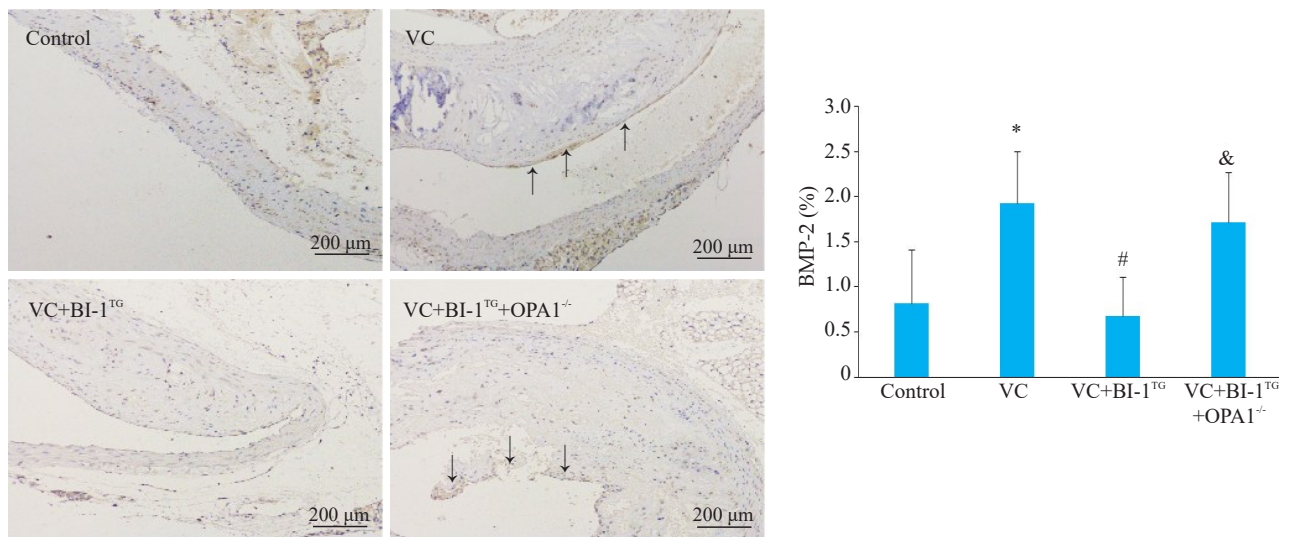


图7 免疫组织化学染色测定 BMP-2 表达
Fig.7 Expression levels of BMP-2 in different groups (n=6). Arrows indicate the BMP-2 positive area. *P<0.01 vs control; #P<0.01 vs VC; &P<0.01 vs VC+BI-1^{Tg}.

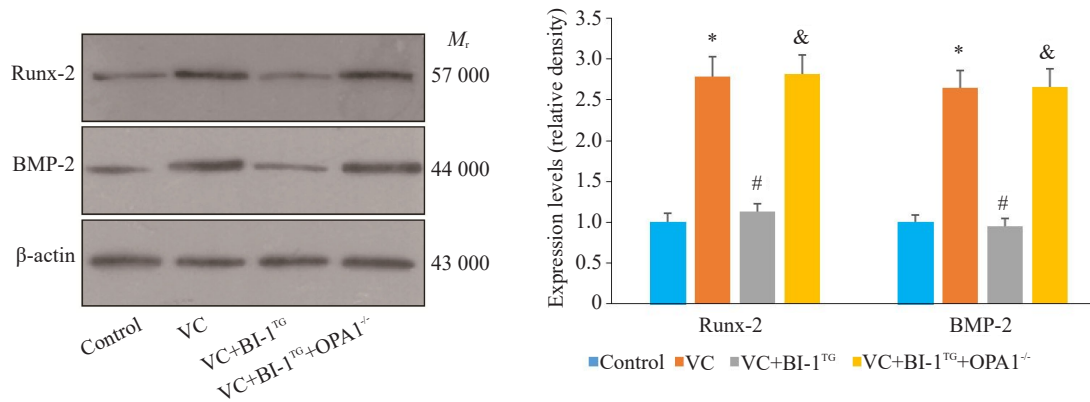


图8 Western blot测定Runx-2蛋白和BMP-2蛋白表达

Fig.8 Protein expression levels of Runx-2 or BMP-2 in different groups ($n=6$). * $P<0.01$ vs control; # $P<0.01$ vs VC; & $P<0.01$ vs VC+BI-1^{TG}.

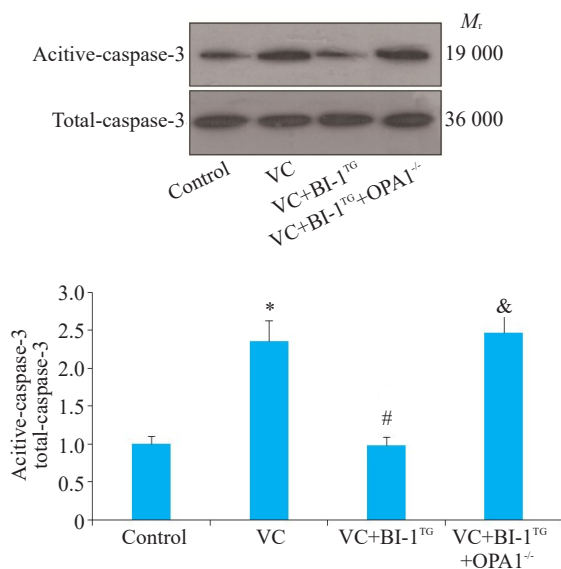


图9 Western blot测定活化的caspase-3蛋白表达

Fig.9 Protein expression levels of active caspase-3 in different groups ($n=6$). * $P<0.01$ vs control; # $P<0.01$ vs VC; & $P<0.01$ vs VC+BI-1^{TG}.

默 OPA1 蛋白后细胞凋亡又恢复到钙化时水平 ($P=0.0002$, 图 10)。

3 讨论

血管钙化在糖尿病血管病变、动脉粥样硬化、慢性肾脏疾病中非常常见,是心血管急症的重要危险因素^[14-16]。血管钙化分为两类:一类是发生在内膜的动脉粥样硬化钙化,另一类是发生在中膜的慢性肾脏疾病或者糖尿病肾脏病的钙化^[17-19]。血管钙化的机制十分复杂,目前认为多种信号转导途径调节的主动过程,类似于骨发育过程。其机制学说主要包括:血管平滑肌细胞成骨型分化学说、钙或磷酸盐稳态失常、细胞凋亡、炎症等^[20-23]。有学者提出 BI-1 在冠状动脉粥样硬化心脏病中发挥一定作用, BI-1 可以抑制心肌微血管内皮细胞凋亡和结构破

坏,进而减轻缺血再灌注引起的心脏损伤^[24]。有研究结果提示过表达 BI-1 能减少心肾综合征引起的心肌细胞凋亡和心脏的损害^[25]。最近研究表明 BI-1 是抗血管平滑肌细胞钙化的关键分子^[3]。本研究通过构建小鼠血管钙化模型,发现血管钙化后, BI-1 蛋白表达明显下降,血管组织钙含量、Runx-2、BMP-2 和活化的 caspase-3 蛋白表达增加,而过表达 BI-1 蛋白能降低细胞钙含量、Runx-2、BMP-2 和活化的 caspase-3 蛋白表达,进而减轻血管钙化。本研究从动物试验方面进一步证实了 BI-1 通过抑制细胞凋亡和细胞骨型分化发挥对血管的保护作用。

血管钙化时,激活线粒体融合/自噬能起到减轻血管钙化的作用^[26-29]。前期研究发现,血管钙化时, OPA1 表达减少,而促进 OPA1 表达能减少线粒体分裂,促进线粒体融合和自噬,保护线粒体结构和功能完整,减少氧化应激损伤等,进而减轻血管钙化^[7,30]。有研究发现 BI-1 能保护肾小管上皮细胞线粒体结构完整,减少线粒体氧化应激,促进线粒体呼吸功能,抑制线粒体分裂和线粒体凋亡,进而减轻急性肾损伤^[12]。有研究发现 BI-1 蛋白能抑制心肌缺血再灌注损伤时线粒体膜通透性转换孔的开放,减少线粒体分裂和线粒体损伤引起的细胞凋亡^[31]。但是血管钙化时 BI-1 是如何调控线粒体融合蛋白 OPA1 的, BI-1 是否通过 OPA1 影响血管钙化,还有待于进一步明确。本研究结果发现,血管钙化后 BI-1 失活抑制 OPA1 蛋白表达,过表达 BI-1 蛋白后 OPA1 蛋白表达增加,结果提示 BI-1 可以调控 OPA1 的表达。另外我们进一步发现过表达 BI-1 能抑制钙沉积、细胞骨型分化和细胞凋亡,而基因敲除 OPA1 蛋白后,钙沉积、细胞骨型分化和细胞凋亡指标增加,血管钙化加重。

综上所述,本研究首次探讨 BI-1/OPA1 通路和血管钙化的关系,并进一步验证了 BI-1 对 OPA1 的调控关系,结果提示血管钙化可以抑制 BI-1,减少 OPA1 表达;

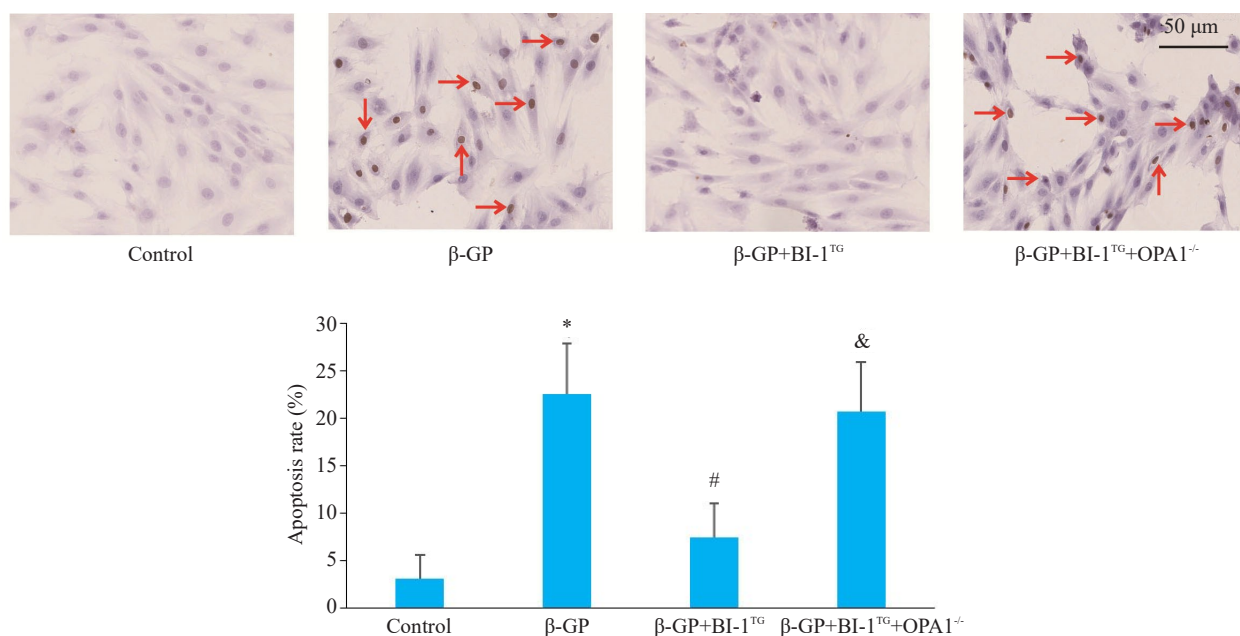


图10 TUNEL法测定血管平滑肌细胞凋亡情况

Fig.10 Apoptosis rate in different groups ($n=6$). Arrows indicate nuclei of brown color as apoptotic cells. * $P<0.01$ vs control; # $P<0.01$ vs β-GP; & $P<0.01$ vs β-GP+BI-1^{TG}.

而促进BI-1蛋白表达,能激活OPA1表达,减轻血管钙化。相信随着研究的深入,将来一定为血管钙化诊断和治疗开辟新的方法和途径。本研究局限性在于缺乏更深入的机制研究,比如内质网应激、线粒体自噬等;另外缺乏BI-1^{TG};ApoE^{-/-}小鼠组、BI-1^{TG};OPA1^{-/-};ApoE^{-/-}小鼠组作为对照,有待进一步研究。

参考文献

[1] Lebeaupin C, Blanc M, Vallée D, et al. BAX inhibitor-1: between stress and survival[J]. FEBS J, 2020, 287(9): 1722-36.

[2] Liu Q. TMBIM-mediated Ca²⁺ homeostasis and cell death [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2017, 1864(6): 850-7.

[3] 陈伟任, 杨霞, 周玉杰, 等. Bax抑制因子1可抑制体外培养的大鼠血管平滑肌细胞的钙化[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(8): 1177-82.

[4] Burke N, Hall A, Hausenloy D. OPA1 in cardiovascular health and disease[J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(8): 912-20.

[5] Ong SB, Kalkhoran SB, Hernández-Reséndiz S, et al. Mitochondrial-shaping proteins in cardiac health and disease—the long and the short of it![J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(1): 87-107.

[6] Song MS, Dorn GW II. Mitoconfusion: noncanonical functioning of dynamism factors in static mitochondria of the heart[J]. Cell Metab, 2015, 21(2): 195-205.

[7] Chen WR, Zhou YJ, Yang JQ, et al. Melatonin attenuates calcium deposition from vascular smooth muscle cells by activating mitochondrial fusion and mitophagy via an AMPK/OPA1 signaling pathway[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2020, 2020: 5298483-9.

[8] Chang X, Zhang T, Meng QY, et al. Quercetin improves cardiomyocyte vulnerability to hypoxia by regulating SIRT1/TMBIM6-related mitophagy and endoplasmic Reticulum stress[J].

Oxidative Med Cell Longev, 2021, 2021: 5529913-8.

[9] Seitaj B, Maull F, Zhang L, et al. Transmembrane BAX inhibitor-1 motif containing protein 5 (TMBIM5) sustains mitochondrial structure, shape, and function by impacting the mitochondrial protein synthesis machinery[J]. Cells, 2020, 9(10): 2147-56.

[10] Kim JH, Lee ER, Jeon K, et al. Role of BI-1 (TEGT)-mediated ERK1/2 activation in mitochondria-mediated apoptosis and splenomegaly in BI-1 transgenic mice[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2012, 1823(4): 876-88.

[11] Zhou H, Wang J, Hu SY, et al. BI1 alleviates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury via modifying mitochondrial fission and inhibiting XO/ROS/F-actin pathways[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 5056-69.

[12] Wang J, Zhu PJ, Li RB, et al. Bax inhibitor 1 preserves mitochondrial homeostasis in acute kidney injury through promoting mitochondrial retention of PHB2[J]. Theranostics, 2020, 10(1): 384-97.

[13] Chai M, Ji QW, Zhang HT, et al. The protective effect of interleukin-37 on vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with diabetes[J]. J Interf Cytokine Res, 2015, 35(7): 530-9.

[14] Gilham D, Tsujikawa LM, Sarsons CD, et al. Apabetalone downregulates factors and pathways associated with vascular calcification [J]. Atherosclerosis, 2019, 280: 75-84.

[15] Chen WR, Yang JQ, Liu F, et al. Melatonin attenuates vascular calcification by activating autophagy via an AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. Exp Cell Res, 2020, 389(1): 111883-90.

[16] Yao HP, Sun Z, Zang GY, et al. Epidemiological research advances in vascular calcification in diabetes [J]. J Diabetes Res, 2021, 2021: 4461311-8.

[17] Yang WL, Zou B, Hou YF, et al. Extracellular vesicles in vascular

- calcification[J]. Clin Chimica Acta, 2019, 499: 118-22.
- [18] 陈韦任, 吴雪萍, 周玉杰, 等. 受体相互作用蛋白激酶3蛋白促进血管平滑肌细胞钙化的作用机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(5): 523-6.
- [19] Tesaro M, Mauriello A, Rovella V, et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification[J]. J Intern Med, 2017, 281(5): 471-82.
- [20] Massy ZA, Drüeke TB. Vascular calcification[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013, 22(4): 405-12.
- [21] Phadwal K, Vrahnas C, Ganley IG, et al. Mitochondrial dysfunction: cause or consequence of vascular calcification[J]? Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 611922-31.
- [22] Chen WR, Zhou YJ, Yang JQ, et al. Melatonin attenuates β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells *via* a Wnt1/ β -catenin signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3139496-504.
- [23] Boraldi F, Lofaro FD, Quaglino D. Apoptosis in the extraosseous calcification process[J]. Cells, 2021, 10(1): 131-40.
- [24] Zhou H, Shi C, Hu SY, et al. B11 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury *via* repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways[J]. Angiogenesis, 2018, 21(3): 599-615.
- [25] Wang J, Wang XH, Du WJ, et al. BI-1 ameliorates myocardial injury by activating the mitochondrial unfolded protein response and FUNDC1-related mitophagy in cardiorenal syndrome type 3[J]. Cell Signal, 2022, 91: 110218-27.
- [26] li M, Zhu Y, Jaiswal SK, et al. Mitochondria homeostasis and vascular medial calcification[J]. Calcif Tissue Int, 2021, 109(2): 113-20.
- [27] Wang PB, Zhang NJ, Wu BQ, et al. The role of mitochondria in vascular calcification[J]. J Transl Intern Med, 2020, 8(2): 80-90.
- [28] Rogers MA, Maldonado N, Hutcheson JD, et al. Dynamin-related protein 1 inhibition attenuates cardiovascular calcification in the presence of oxidative stress[J]. Circ Res, 2017, 121(3): 220-33.
- [29] Zhu Y, Han XQ, Sun XJ, et al. Lactate accelerates vascular calcification through NR4A1-regulated mitochondrial fission and BNIP3-related mitophagy[J]. Apoptosis, 2020, 25(5/6): 321-40.
- [30] Chen WR, Zhou YJ, Sha Y, et al. Melatonin attenuates vascular calcification by inhibiting mitochondria fission *via* an AMPK/Drp1 signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6043-54.
- [31] Zhou H, Toan S, Zhu PJ, et al. DNA-PKcs promotes cardiac ischemia reperfusion injury through mitigating BI-1-governed mitochondrial homeostasis[J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115(2): 1-17.

(编辑:林萍)