

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.20.002 [http://www.crter.org] 金波,尹恒冲,汪凌清,包丽雯,李延林,朱军,施海明.平滑肌细胞成骨分化致血管钙化中MAPK 信号通路基因的表达谱变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(20):3618-3625.

# 平滑肌细胞成骨分化致血管钙化中MAPK信号通路基因的表达谱变化\*☆

金 波<sup>1</sup>, 尹恒冲<sup>2</sup>, 汪凌清<sup>1</sup>, 包丽雯<sup>1</sup>, 李延林<sup>1</sup>, 朱 军<sup>1</sup>, 施海明<sup>1</sup>

1 复旦大学附属华山医院心内科,上海市 200040

2 河南省汝阳县人民医院心内科,河南省洛阳市 471200

#### 文章亮点:

1 建立 5/6 肾切除 ApoE-/-小鼠主动脉斑块钙化的动物模型,应用 Agilent 小鼠全基因芯片筛查 MAPK 信号通路的差异表达基因,初步探讨尿毒症背景下动脉粥样硬化血管钙化的病理生理机制。

2 从分子、细胞和个体水平上开展整合性研究,初步探讨 MAPK 信号通路对血管钙化的病理生理进程 的影响,相关结果有助于进一步阐明该信号通路在平滑肌细胞成骨分化致血管钙化中的作用及其机制, 为临床治疗提供有意义的靶点。

#### 关键词:

组织构建;骨组织构建;动脉粥样硬化;血管钙化;尿毒症;平滑肌细胞;丝裂原活化蛋白激酶;基因芯片;表达谱;MAPK 信号通路;形态学变化;差异表达基因;国家自然科学基金

#### 摘要

**背景**:血管钙化是一种细胞介导的主动的、可调控的复杂生物学过程,血管平滑肌细胞转分化为成骨样 细胞发挥着重要作用,其确切机制尚不清楚。

目的: 探讨尿毒症背景下动脉粥样硬化血管钙化的病理生理机制。

方法:采用 5/6 肾切除法建立尿毒症背景下 ApoE-/-小鼠动脉血管钙化模型,苏木精-伊红染色和 Von Kossa 染色观察主动脉组织形态学特点,明确造模成功。应用小鼠全基因组 Agilent 芯片筛查 MAPK 信号通路的差异表达基因,实时定量 PCR 分析验证部分与 MAPK 信号通路相关的差异表达基因,并结合 通路分析来探索 MAPK 信号通路与血管钙化的内在联系。

结果与结论:造模 12 周后,尿毒症 ApoE-/-小鼠主动脉组织形态学特点证实动脉粥样硬化钙化斑块形成。 Agilent 基因芯片检测结果显示,MAPK 信号通路中存在 14 个差异表达基因,RT-PCR 验证结果与芯片 检测结果相符合。经 KEGG 通路分析,ERK1/2 信号通路可能在血管钙化的病理生理过程中扮演着重要 的角色。说明 5/6 肾切除 ApoE-/-小鼠主动脉钙化斑块形成与 MAPK 信号通路激活密切相关,该信号通 路可能在平滑肌细胞转分化过程中起着至关重要作用。

# Expression prolife of mitogen-activated protein kinase pathway genes in vascular calcification associated with osteogenic differentiation of smooth muscle cells

Jin Bo<sup>1</sup>, Yin Heng-chong<sup>2</sup>, Wang Ling-qing<sup>1</sup>, Bao Li-wen<sup>1</sup>, Li Yan-lin<sup>1</sup>, Zhu Jun<sup>1</sup>, Shi Hai-ming<sup>1</sup>

1 Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China 2 Department of Cardiology, Ruyang People's Hospital, Luoyang 471200, Henan Province, China

#### Abstract

**BACKGROUND:** Vascular calcification is recognized as an active and regulated biological process involving osteoblast-like cell transdifferentiation of vascular smooth muscle cells. However, the precise mechanism of vascular calcification is still unclear.

金波☆, 男, 1977 年生, 安徽省淮南市人, 汉族, 2007 年复旦大学附属华 山医院毕业, 医学博士, 主治医师, 主要从事冠心 病的基础和临床研究。 jinbo7711@yahoo. com.cn

通讯作者: 施海明, 医学 博士,主任医师, 教授, 博士生导师,复旦大学附 属华山医院心内科,上海 200040 shihmhs@yahoo.com.cn

中图分类号:R318 文献标识码:A 文章编号:2095-4344 (2013)20-03618-08

收稿日期: 2012-10-18 修回日期: 2012-11-20 (20120818009/D·Y) Jin Bo☆, M.D., Attending physician, Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China jinbo7711@yahoo.com.cn

Corresponding author: Shi Hai-ming, M.D., Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China shihmhs@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81100157\*

Received: 2012-10-18 Accepted: 2012-11-20 OBJECTIVE: To explore the pathophysiological mechanism of atherosclerotic calcification in uremic mice.

**METHODS:** The animal model of atherosclerotic calcification in Apolipoprotein E knock-out mice was established with 5/6 nephrectomy. Histomorphological changes of aorta sections of mice were evaluted by hematoxylin-eosin staining and Von Kossa staining to confirm atherosclerotic calcification. The differentially expressed genes in mitogen-activated protein kinase pathway were evaluated using mouse whole-genome Agilent chip. Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction was used to verify gene expression changes related to mitogen-activated protein kinase pathway, and combined with pathway analysis to explore the relationship between mitogen-activated protein kinase pathway and vascular calcification.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The histomorphological changes of aorta sections of uremic Apolipoprotein E knock-out mice indicated atherosclerotic calcification after 12 weeks of modeling. Microarray hybridization identified fourteen differentially expressed genes in the mitogen-activated protein kinase pathway, which have significantly altered their expression levels during atherosclerotic calcification. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction results were consistent with the chip validation. The extracellular signal-regulated kinase 1/2 signal transduction pathway played an important role in vascular calcification, identified by KEGG pathway analysis. Experimental findings indicate that, atherosclerotic calcification in Apolipoprotein E knock-out mice with 5/6 nephrectomy is closely associated with mitogen-activated protein kinase signaling pathway, which plays an important role in smooth muscle phenotypic transition.

**Key Words:** tissue construction; bone tissue construction; atherosclerosis; vascular calcification; uremia; smooth muscle cells; mitogen activated protein kinase; gene chip; expression profile; mitogen-activated protein kinase signaling pathway; morphology; differentially expressed gene; National Natural Science Foundation of China

Jin B, Yin HC, Wang LQ, Bao LW, Li YL, Zhu J, Shi HM. Expression prolife of mitogen-activated protein kinase pathway genes in vascular calcification associated with osteogenic differentiation of smooth muscle cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(20): 3618-3625.

#### 0 引言

血管钙化是医学领域中的重大临床问题,是心脑血管事件发生率和死亡率显著增加的重 要危险因素<sup>[1-2]</sup>。既往认为血管钙化是机体钙磷代谢紊乱所致的被动性钙盐沉积的结果,是疾 病过程或退行性变中普遍存在的病理表现。新近研究表明,血管钙化是一种类似于骨和软骨 形成的主动的、可预防、可调控的复杂生物学过程,主要特征是血管平滑肌细胞由收缩表型 向成骨样细胞表型转分化<sup>[3-4]</sup>。血管平滑肌细胞在特定环境下表达成骨细胞表型是血管钙化过 程的中心环节<sup>[5-6]</sup>,多条信号通路、多种细胞因子共同参与该病理生理过程。丝裂原活化蛋白 激酶信号通路是动物体内重要的信号转导通路,血管平滑肌细胞成骨分化致血管钙化的病理 过程中,丝裂原活化蛋白激酶信号通路基因表达水平的变化却未见报道。

本文采用5/6肾切除法建立尿毒症ApoE基因敲除(ApoE-/-)小鼠动脉血管钙化模型,应用 Angilent小鼠全基因芯片检测丝裂原活化蛋白激酶信号通路基因在血管钙化中的表达谱变 化,为进一步探讨丝裂原活化蛋白激酶信号通路中差异表达基因在平滑肌细胞成骨分化致血 管钙化中的调控作用提供研究基础。

#### 1 材料和方法

设计:随机对照动物实验。

时间及地点:实验于2011年9月至2012年3月在复旦大学上海医学院实验动物中心完成。 材料:

实验动物:健康8周龄SPF级雄性ApoE-/-小鼠(C57BL/6J--KO)30只,健康雄性C57BL/6J 小鼠(背景品系)10只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号: SCXK(京)2006-0008。

饲料来源:高脂饲料与普通饲料均购于斯莱康实验动物专用饲料,中科院上海实验动物中心。

方法:

**实验动物分组**:①动脉粥样硬化钙化组:取20只 ApoE-/-小鼠,二步外科手术5/6肾脏切除法建立尿毒症 模型<sup>[7]</sup>,高脂饲料喂养,自由取食。②动脉粥样硬化组: 10只ApoE-/-小鼠行双侧肾脏被膜剥离假手术,高脂饲 料喂养,自由取食。③对照组:10只野生型C57BL/6J 小鼠行双侧肾脏被膜剥离假手术,普通饲料喂养,每天 自由取食。

标本采集:造模12周后采集小鼠主动脉和血标本,每组小鼠空腹过夜,晨起3%戊巴比妥钠麻醉,固定于操作台上,快速剪开胸骨,心腔内采血0.8 mL送检,分离血清稀释5倍测定血脂和肾功能指标。采血后直视条件下快速分离主动脉根部至腹主动脉,依据实验需求留取适量主动脉组织标本分别快速冻存于液氮中备基因芯片检测和PCR分析;体积分数10%中性甲醛固定主动脉标本,石蜡包埋,制备4 µm切片,常规方法行主动脉苏木精-伊红染色和von Kossa染色。

RNA抽提和纯化:取液氮冻存的小鼠主动脉组织,利用Trizol Regent抽提总mRNA,经Agilent Bioanalyzer 2100 电泳质检合格后,采用RNeasy mini kit和RNase-Free DNase Set纯化总mRNA。纯化样品的 $A_{260}$ :  $A_{280}$ 比值应在1.8-2.0,2100 RIN≥7.0,同时琼脂 糖电泳结果需显示核酸的28S/18S≥0.7。纯化后,将每 组6只小鼠主动脉标本总mRNA等量混合,用于下一步 的芯片实验。

芯片实验: 采用Agilent表达谱4×44K芯片(ID:014868) 配套试剂盒和标准操作流程对样品总mRNA进行放大 和标记,并用RNeasy mini kit纯化标记好的cRNA。在 滚动杂交炉中65 ℃,10 r/min杂交17 h,杂交cRNA上 样量为1.65 µg,并在洗缸中洗片。完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描,Feature Extraction软件读取数据,Gene Spring软件进行归一化 处理。

数据分析:根据杂交信号,将基因分为表达(Present, P)、模糊表达(Marginal, M)和缺失(Absent, A)3种情况。 组间基因变化水平进行比较,其比值(Ratio)进行log2 对数处理,FC>2为基因表达明显上调,FC<0.5为基因 表达明显下调。采用SAS系统在线分析,上传已筛选的 差异基因数据表,直接进行Annotation分析。

**实时荧光定量PCR验证基因芯片结果**: 对差异表达的基 因经**GO**分析找出与丝裂原活化蛋白激酶信号通路相关 的基因,并做RT-PCR对基因芯片结果进行验证。目标 基因的引物及探针序列根据GenBank数据库的序列,利 用Primer5.0引物设计与分析软件设计。

Rasgrp1引物序列上游: 5' GAG ACA GAA ATT CAC AAC GGT CA 3',下游: 5'CAC GAC TTT AGT TTG GCC AGG 3'; Map3k1引物上游序列: 5'GGT TTC CAA ATG AGT GGT TTG 3',下游: 5'CAA TTT AAG ATT CAT TGG GGA G 3'; Rps6ka1引物序列上游: 5'CAG TGC AGA CGA ACT CCT CAG AGG C 3',下 游: 5'TCT GAG AGG CGA CAC TGG ACC TGC 3'; 内参GAPDH引物序列上游: 5'ATG CTG GCG CTG AGT ACG T 3',下游: 5'AGC CCC AGC CTI CTC CAT 3'。

引物及探针序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,具体操作按反转录试剂盒提供的方法进行,实验验结果由荧光定量分析软件lcycler version 3.1.1050荧光定量分析软件读取。

**主要观察指标**:①尿毒症背景下动脉血管钙化 ApoE-/-小鼠的血脂和肾功能指标。②小鼠主动脉组织 形态学特点。③基因芯片RNA样品的质量控制。④基因 芯片检测丝裂原活化蛋白激酶信号通路基因在血管钙 化中的表达谱变化。

统计学方法:由第一作者采用SPSS 13.0软件进行 统计分析,计量资料以**x**±s表示,组间比较采用独立样 本*t*检验,*P*<0.05为差异有显著性意义。

#### 2 结果

2.1 实验动物数量分析 动脉粥样硬化钙化组共20 只SPF级ApoE-/-小鼠接受二步外科手术5/6肾脏切除 法建立尿毒症模型,造模手术操作直接导致6只小鼠死 亡,主要与创面出血密切相关,高脂饲料喂养过程中3 只小鼠死亡;动脉粥样硬化组行假手术操作无小鼠死 亡;对照组假手术过程中1只小鼠死亡,与麻醉药过量 有关。

2.2 血脂和肾功能测定 对照组野生型C57BL/6J小鼠 的血脂和肾功能指标均在正常范围内;动脉粥样硬化组 ApoE-/-小鼠血清三酰甘油、胆固醇和低密度脂蛋白值 均显著高于对照组;动脉粥样硬化钙化组和动脉粥样硬 化组ApoE-/-小鼠的血脂水平差异无显著性意义;动脉 粥样硬化钙化组小鼠血清尿素氮和肌酐值显著高于动 脉粥样硬化组(P<0.05),见表1。

表 1	动脉粥样硬化钙化组、	动脉粥样硬化组以及对照组小鼠
	血脂和肾功能指标的比	比较

Table 1Evaluation of serum lipids and renal function index of<br/>mice in each group $(\bar{x}\pm s)$ 

指标	对照组( <b>n=9)</b>	动脉粥样硬化 组 ( <b>n=10)</b>	动脉粥样硬化钙化 组 (n=11)
三酰甘油(mmol/L)	1.92±0.10	4.20±0.67 <sup>a</sup>	3.57±0.45
胆固醇(mmol/L)	2.24±0.27	22.45±3.68 <sup>a</sup>	22.24±3.92
低密度脂蛋白(mmol/L)	0.20±0.04	4.66±1.02 <sup>a</sup>	5.51±1.03
尿素氮(mmol/L)	8.77±2.49	9.60±1.46	20.36±3.24 <sup>b</sup>
肌酐 (µmol/L)	95.00±29.44	94.70±24.01	271.91±42.42 <sup>b</sup>

与对照组比较,  ${}^{a}P < 0.05$ ; 与动脉粥样硬化组比较,  ${}^{b}P < 0.05$ 。

注: 对照组野生型 C57BL/6J 小鼠血脂和肾功能指标均在正常范围内; 动脉粥样硬化组 ApoE-/-小鼠血清三酰甘油、胆固醇和低密度脂蛋白值均显著 高于对照组;动脉粥样硬化钙化组和动脉粥样硬化组 ApoE-/-小鼠的血脂水 平差异无显著性意义。

## 2.3 主动脉组织形态学特点

苏木精-伊红染色:对照组C57BL/6J小鼠主动脉内 膜、中膜和外膜结构清晰,内膜面光滑,内皮细胞结构 完整,见图1A;动脉粥样硬化组ApoE-/-小鼠主动脉内 膜面脂质斑块形成,斑块中央可见泡沫细胞,细胞间少 量胆固醇结晶沉积,见图1B;动脉粥样硬化钙化组尿毒 症加速ApoE-/-小鼠主动脉粥样硬化斑块形成,巨噬细 胞浸润,胆固醇结晶沉积,血管平滑肌细胞增生显著, 见图1C。

von Kossa染色: 对照组C57BL/6J小鼠主动脉结构完整,未发现蓝黑色颗粒沉积,见图2A; 动脉粥样硬化组ApoE-/-小鼠主动脉内膜仅偶见蓝黑色颗粒沉积,钙化程度较轻,见图2B; 动脉粥样硬化钙化组尿毒症ApoE-/-小鼠主动脉管壁平滑肌细胞排列紊乱,内膜和中膜弥漫的蓝黑色颗粒沉积,血管钙化显著,见图2C。

2.4 基因芯片样品的质量鉴定 用Trizol试剂一步法抽 提3组小鼠主动脉平滑肌组织总RNA,QIAGEN RNAeasy mini kit 纯化RNA,应用Agilent 2100 Bioanalyzer测定RNA浓度和纯度,对样品进行变性琼脂 糖凝胶电泳,18S和28S条带清晰可见,见图3,质检指 标2100 RIN≥7.0且28S/18S≥0.7,结果表明样品总 RNA纯度较高,RNA无明显降解,符合基因芯片检测要 求。

2.5 基因芯片检测结果 应用Agilent小鼠全基因组表

达谱芯片检测3组小鼠主动脉平滑肌组织mRNA表达,见图4。







B: 动脉粥样硬化组



C: 动脉粥样硬化钙化组

箭头示主动脉内膜面动脉粥样硬化斑块形成。

注:对照组 C57BL/6J 小鼠主动脉内膜、中膜和外膜结构清晰, 内膜面光滑,内皮细胞结构完整:动脉粥样硬化组 ApoE-/-小鼠 主动脉内膜面脂质斑块形成,斑块中央可见泡沫细胞,细胞间少 量胆固醇结晶沉积:动脉粥样硬化钙化组尿毒症加速 ApoE-/-小 鼠主动脉粥样硬化斑块形成,巨噬细胞浸润,胆固醇结晶沉积, 血管平滑肌细胞增生显著。

- 图 1 对照组、动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化钙化组小鼠 主动脉苏木精-伊红染色组织形态学特点(×100)
- Figure 1 Histomorphological characteristics of aorta sections of mice in each group (Hematoxylin-eosin staining, ×100)



#### 箭头示蓝黑色颗粒沉积表明主动脉内膜钙化。

注:对照组 C57BL/6J 小鼠主动脉结构完整,未发现蓝黑色颗粒沉积;动脉粥样硬化组 ApoE-/-小鼠主动脉内膜仅偶见蓝黑色颗粒沉积,钙化程度较轻;动脉粥样硬化钙化组尿毒症 ApoE-/-小鼠主动脉管壁平滑肌细胞排列紊乱,内膜和中膜弥漫的蓝黑色颗粒沉积。

- 图 2 对照组、动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化钙化组小鼠 主动脉 von Kossa 染色组织形态学特点(×100)
- Figure 2 Histomorphological characteristics of aorta sections of mice in each group (von Kossa staining, ×100)



注: 18S 和 28S 条带清晰可见,质检指标 2100 RIN≥7.0 且 28S/18S≥0.7,结果表明样品总 RNA 纯度较高,符合基因芯片 检测要求。

- 图 3 对照组、动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化钙化组小鼠 主动脉平滑肌组织总 RNA 电泳图
- Figure 3 Electropherogram of total RNA of aorta samples of mice in each group



A: 对照组



B: 动脉粥样硬化组



C: 动脉粥样硬化钙化组

注:动脉粥样硬化钙化组小鼠 p38 MAPK 和 ERK1/2 途径部分 相关基因 mRNA 表达上调。

- 图 4 对照组、动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化钙化组小鼠 全基因组表达谱芯片扫描图
- Figure 4 Agilent whole genome gene expression microarray scanning image of mice in each group

通过对基因芯片结果中差异表达的基因进行GO分 析找出与丝裂原活化蛋白激酶信号通路相关的基因,初 步结果提示,尿毒症ApoE-/-小鼠p38 丝裂原活化蛋白 激酶和ERK1/2途径部分相关基因mRNA表达上调,见 表2。

|--|

 Table 2
 Differential expression of mitogen-activated protein kinase pathway genes in mice

组别	MAPK (Hits/Total)	p38 MAPK (Hits/Total)	ERK1/2 (Hits/Total)
对照组	3/77	1/31	1/28
动脉粥样硬化组	11/77	3/31	4/28
动脉粥样硬化钙化组	14/77 <sup>a</sup>	5/31ª	6/28 <sup>ª</sup>

注:动脉粥样硬化钙化组小鼠相关基因 mRNA 表达上调。

2.5 实时荧光定量PCR结果 选择丝裂原活化蛋白激 酶通路中3个差异表达的关键基因,应用实时荧光定量 PCR法验证Rasgrp1、Map3k1和Rps6ka1基因的相对 表达水平,见表3,应用Spearman相关分析,RT-PCR 检测结果与基因芯片检测结果相吻合。

Table 3	Differential gene expression changes detected by fluorescent quantitative reverse transcriptase-				
polymerase chain reaction $(\bar{x}\pm s, n=0)$					
	狙别	Rasgrp1	Map3k1	Rps6ka1	
21.7.1		10125	100061688	20111	
对照组		1.06±0.42	0.96±0.23	1.14±0.34	
动脉粥样	硬化组	1.25±0.36	1.24±0.28	1.02±0.31	
动脉粥样硬化钙化组		14.72±3.45 <sup>a</sup>	8.96±2.12 <sup>ª</sup>	11.32±3.13 ª	
占甘仙西	细レ菘 ┏ィ	0.05			

注: 动脉第杆硬化钙化组小晶 Rasgipi、Mapaki和 Rpsokai 蓝凸相对表达水平上调。

### 3 讨论

血管钙化可以分为内膜钙化、中膜钙化和瓣膜钙 化。内膜钙化与动脉粥样硬化分布一致,在损伤早期即 可观察到羟基磷灰石结晶沉积,主要与动脉粥样硬化斑 块的稳定性有关;中膜钙化在慢性肾脏疾病和糖尿病中 更为常见,类似于骨和软骨形成,主要表现为血管壁顺 应性降低;瓣膜钙化目前认为是一个与动脉粥样硬化类 似的过程,高血压、糖尿病、脂代谢紊乱和氧化应激均 是其危险因素,软骨骨化生是瓣膜钙化常见的特征<sup>[8-10]</sup>。

目前认为多种因素参与了血管钙化的发病过程,提 出了骨形成蛋白调节学说、细胞控制学说、凋亡体基质 囊泡学说和氧化应激学说等多种假说,但这些学说均难 以解释临床常见血管钙化与骨质疏松并存的现象<sup>[11-12]</sup>。 尿毒症背景下动脉粥样硬化患者血管钙化的原因是什 么?目前仅有临床研究表明循环中钙磷乘积水平的增高 与血管钙化的发生率增加相关。因此,明确尿毒症患者 冠状动脉钙化斑块的发生机制十分重要。

血管平滑肌细胞在特定环境下表达成骨细胞表型 是血管钙化过程的中心环节<sup>[13-15]</sup>。成骨细胞和平滑肌细 胞均起源于间充质细胞,羟磷灰石在成骨细胞内形成, 在细胞膜上融缩,从细胞膜上脱落形成基质小泡,结合 到I型胶原和非胶原基质蛋白上形成钙化。成骨细胞已完 全分化,不能再进入细胞周期,而平滑肌细胞还保留其 多能性,具有转分化为成骨样细胞的能力。

丝裂原活化蛋白激酶信号通路是真核细胞中的一个 重要信号系统,能将细胞外刺激信号转导至细胞及其核 内,并引起细胞增殖、转分化及凋亡<sup>[16-17]</sup>。研究表明, 丝裂原活化蛋白激酶 信号转导通路采用高度保守的三 级激酶级联传递信号,不同的细胞外刺激可以激活不同 的丝裂原活化蛋白激酶信号通路,通过其相互调控而介 导不同的细胞生物学反应。在哺乳动物细胞中目前已发 现4条并行的丝裂原活化蛋白激酶信号通路,其中与 ERK1/2相关的细胞内信号转导途径被认为是经典丝裂 原活化蛋白激酶信号转导途径,ERK1/2介导的生物学效 应十分广泛,作为细胞应答环境刺激的主要信号分子之 一,同样涉及细胞的多种理化应激的刺激。在丝裂原刺 激后, ERK接受上游的级联反应信号, 可以转位进入细 胞核,从而参与细胞增殖与分化的调控<sup>[18-19]</sup>。p38是丝裂 原活化蛋白激酶家族的重要成员,在细胞受到多种刺激的 作用下,p38 丝裂原活化蛋白激酶可以被磷酸化激活, 进而引发下游效应分子的激活并介导细胞应激、凋亡、 增殖、分化以及炎症反应等多种重要的信号通路[20-21]。

实验应用Agilent小鼠全基因组表达谱芯片检测丝 裂原活化蛋白激酶信号通路基因在血管钙化中的表达

谱变化,通过对基因芯片结果中差异表达的基因进行 GO分析找出与丝裂原活化蛋白激酶信号通路相关的基 因,进一步分析p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路发 现,5/6肾切除ApoE-/-小鼠主动脉钙化斑块形成与p38 丝裂原活化蛋白激酶 信号通路激活存在一定程度的关 联,其内在确切调控机制尚有待深入探讨。ERK1/2信 号通路是最具代表性丝裂原活化蛋白激酶信号转导途 径,也是迄今研究得最为活跃的信号通路之一,ERK1/2 途径短暂激活可以促进血管平滑肌细胞生长, 而持续激 活则可以诱导血管平滑肌细胞 转分化为成骨样细 胞<sup>[22-23]</sup>。在血管钙化的过程中, 血管平滑肌细胞向成 骨样细胞的表型转化是细胞事件的主要环节,是细胞介 导的可以主动调节的过程[24-26]。血管平滑肌细胞在转分 化过程中受到多种来自胞外的信号及其相关通路的调 控<sup>[27-30]</sup>, ERK1/2信号通路是真核细胞调控机制中介导 细胞内信号传导的重要系统,令人感兴趣的是实验研究 发现,5/6肾切除ApoE-/-小鼠主动脉钙化斑块形成与丝 裂原活化蛋白激酶 信号通路激活密切相关,其中 ERK1/2信号通路可能在平滑肌细胞转分化过程中起着 至关重要作用,但确切机制尚未明了,目前尚未见系统 的研究报道<sup>[30-36]</sup>。

该实验通过应用基因芯片技术,从mRNA水平探讨 尿毒症背景下动脉粥样硬化钙化过程中丝裂原活化蛋 白激酶信号通路基因的表达变化,初步证实丝裂原活化 蛋白激酶信号通路可能参与调控血管钙化的病理生理 进程,为进一步研究丝裂原活化蛋白激酶信号通路对血 管钙化的作用提供理论基础。本课题相关结果有助于进 一步阐明平滑肌细胞成骨分化致血管钙化的病理生理 机制,为今后临床治疗提供有意义的靶点。

**致谢**:感谢复旦大学上海医学院实验动物中心的老师在动 物实验中给予的帮助和支持。

基金资助: 国家自然科学基金项目(81100157)。

*作者贡献*:实验设计为施海明,实验实施为尹恒冲和汪凌 清,实验评估为朱军,资料收集为包丽雯和李延林,金波成文, 施海明审校,金波和施海明对文章负责。

*利益冲突*: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组 织直接或间接的经济或利益的赞助。

*伦理要求*:实验过程中对小鼠处置符合相关动物伦理学标 准的条例。

**本文创新性**:血管钙化是医学领域中的重大临床问题,是 心脑血管事件发生率和死亡率显著增加的重要危险因素。研究 表明,血管钙化是一种类似于骨和软骨形成的主动的、可预防、 可调控的复杂生物学过程,涉及到炎症、代谢和各种骨形成诱 导因素。对血管钙化的发病机制进行深入研究,探索新的治疗 策略,提高临床疗效具有重要的理论价值和现实意义。

**作者声明**:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密, 无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他 人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献

- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. Circ Res. 2006;99(10):1044-1059.
- [2] Lee MJ, Shin DH, Kim SJ, et al. Progression of aortic arch calcification over 1 year is an independent predictor of mortality in incident peritoneal dialysis patients. PLos One. 2012;7(11):e48793.
- [3] Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, et al.Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. J Intern Med. 2006;260(3):192-210.
- [4] Zhu D, Mackenzie NC, Millán JL, et al. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. PLos One. 2011;6(5):e19595.
- [5] Tanaka T, Sato H, Doi H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells. Mol Cell Biol. 2008;28(3):1147-1160.
- [6] Speer MY, Li X, Hiremath PG, et al. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. J Cell Biochem. 2010;110(4):935-947.
- [7] Gagnon RF, Gallimore B. Characterization of a mouse model of chronic uremia. Urol Res. 1988;16(2):119-126.
- [8] Duan XH, Qi YF, Tang CS. Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi.
   2008;16(2):153-157.
   段晓辉,齐永芬,唐朝枢. 血管钙化动物模型的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2008,16(2):153-157.
- [9] Cheng XZ,Huang B, Zhong H. Shengwu Jishu Tongxun. 2010; 21(1):112-115.
   程孝中,黄蓓,钟辉.动脉钙化发生机制研究进展[J].生物技术通讯, 2010,21(1):112-115.
- [10] Neven E, D'Haese PC. Vascular calcification in chronic renal failure: what have we learned from animal studies? Circ Res. 2011;108(2):249-264.
- [11] Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. Circ Res. 2004;95(6):560-567.
- You HZ, Ding F. Guoji Miniao Xitong Zazhi. 2007;27(2):
   244-247.
   游怀舟,丁峰. 慢性肾脏病血管钙化的研究进展[J]. 国际泌尿系 统杂志,2007,27(2): 244-247.
- [13] Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. Circ Res. 2010;107(4):485-494.
- [14] Boström KI, Jumabay M, Matveyenko A, et al. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. Circ Res. 2011;108(4):446-457.

- [15] Nakagami H, Osako MK, Morishita R. New concept of vascular calcification and metabolism. Curr Vasc Pharmacol. 2011;9(1):124-127.
- [16] Lai LQ, Yuan YS, Hao J, et al. 2010;32(10):1043-1050. 赖林泉,袁运生,郜尽,等. MAPK信号通路基因在小鼠肝再生中的 表达谱变化[J]. 遗传, 2010,32(10):1043-1050.
- [17] Miersalijiang•Yasen, Guo CJ, Fei QM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(27): 4975-4978.

米尔萨力江•亚森,郭常军,费琴明,等.基因芯片分析成骨生长肽 对OPG-/-小鼠骨髓间充质干细胞的作用[J].中国组织工程研究 与临床康复,2011,15(27):4975-4978.

- [18] Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? Cell Cycle. 2009;8(8):1168-1175.
- [19] Meloche S, Pouysségur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. Oncogene. 2007;26(22):3227-3239.
- [20] Oeztuerk-Winder F, Ventura JJ. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation. Biochem J. 2012;445(1):1-10.
- [21] del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. Biochem Soc Trans. 2012;40(1): 79-84.
- [22] Ding HT, Wang CG, Zhang TL, et al. Fibronectin enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via ERK pathway. J Cell Biochem. 2006;99(5):1343-1352.
- [23] You H, Yang H, Zhu Q, et al. Advanced oxidation protein products induce vascular calcification by promoting osteoblastic trans-differentiation of smooth muscle cells via oxidative stress and ERK pathway. Ren Fail. 2009;31(4): 313-319.
- [24] Panizo S, Cardus A, Encinas M, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. Circ Res. 2009;104(9): 1041-1048.
- [25] Tseng W, Graham LS, Geng Y, et al. PKA-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in vascular cells mediates osteoclastogenesis but not matrix calcification. J Biol Chem. 2010;285(39):29925-29931.
- [26] Di Bartolo BA, Schoppet M, Mattar MZ, et al. Calcium and osteoprotegerin regulate IGF1R expression to inhibit vascular calcification. Cardiovascu Res. 2011;91(3):537-545.

[27] Zheng MT, Xue J, You HZ, et al. Zhongguo Xueye Jinghua.
 2008;7(2):81-84.
 郑曼韬,薛骏,游怀舟,等.他汀类药物对高磷介导血管平滑肌细胞

承受码,辞教,研怀为,寻.他们关约初初高幽升寻血量干得加细胞 成骨细胞转分化和钙化的影响[J]. 中国血液净化,2008,7(2): 81-84.

- [28] Kavurma MM, Schoppet M, Bobryshev YV, et al. TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. J Biol Chem. 2008;283(12):7754-7762.
- [29] Chan J, Prado-Lourenco L, Khachigian LM, et al. TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation in a FGF-2-, Sp1 phosphorylation-, and NFkappaB-dependent manner. Circ Res. 2010;106(6):1061-1071.
- [30] Li J, Li P, Zhang Y, et al. c-Ski inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells via suppressing Smad3 signaling but stimulating p38 pathway. Cell Signal. 2012;25(1): 159-167.
- [31] Bironaite D, Brunk U, Venalis A. Protective induction of Hsp70 in heat-stressed primary myoblasts. Involvement of MAPKs. J Cell Biochem. 2013 Mar 28.
- [32] Iwayama H, Ueda N. Role of mitochondrial Bax, caspases, and MAPKs for ceramide-induced apoptosis in renal proximal tubular cells. Mol Cell Biochem. 2013 Mar 31.
- [33] Wei ZF, Tong B, Xia YF, et al. Norisoboldine Suppresses Osteoclast Differentiation through Preventing the Accumulation of TRAF6-TAK1 Complexes and Activation of MAPKs/NF-κB/c-Fos/NFATc1 Pathways. PLoS One. 2013; 8(3):e59171.
- [34] Ma X, You X, Zeng Y, et al. Mycoplasma MALP-2 induces HO-1 expression via MAPKs and Nrf2 pathways to modulate COX-2 expression in human monocytes. Clin Vaccine Immunol. 2013 Mar 27.
- [35] Long X, Cowan SL, Miano JM. Mitogen-activated protein kinase 14 is a novel negative regulatory switch for the vascular smooth muscle cell contractile gene program. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(2):378-386.
- [36] Kim M, Kim S, Lim JH, et al. Laminar flow activation of ERK5 protein in vascular endothelium leads to atheroprotective effect via NF-E2-related factor 2 (Nrf2) activation. J Biol Chem. 2012;287(48):40722-40731.