



外泌体调控血管钙化的研究进展

苏冠月, 汪小力, 裴童, 杨帆, 刘肖珩, 沈阳*

四川大学华西基础医学与法医学院, 生物医学工程研究室, 成都 610041

* 联系人, E-mail: shenyang24@126.com

收稿日期: 2020-05-18; 接受日期: 2020-06-25; 网络版发表日期: 2020-08-05

国家自然科学基金(批准号: 31870939, 11932014, 31971239)资助

摘要 血管钙化是钙、磷等矿物质在血管壁的异常沉积, 是一个主动的、活跃的、被高度调控的生物学过程, 受到钙磷代谢紊乱、氧化应激、机械应力和炎症等多种因素的影响。作为胞间通讯的重要载体, 外泌体已被证实与血管钙化的发生密切相关。一方面, 外泌体可以通过在细胞间传递蛋白质、microRNAs等信息, 促进血管平滑肌细胞发生成骨样表型转化以及矿物质沉积; 另一方面, 外泌体还可以诱导血管内皮细胞发生内皮-间充质转化, 进而调控血管钙化的进程。但是, 外泌体在内皮细胞和平滑肌细胞参与血管钙化进程中的具体作用及机制目前尚不完全清楚。本文就外泌体在调节平滑肌细胞的成骨样表型转化、矿物质沉积、microRNA转运以及内皮细胞的内皮-间充质转化中的作用进行了综述, 以期对血管钙化的防治提供新思路。

关键词 血管钙化, 外泌体, 平滑肌细胞, 内皮细胞, 表型转化

血管钙化(vascular calcification, VC)是钙、磷等矿物质以羟基磷灰石的形式在血管壁的异常沉积, 常发生于主动脉、主动脉瓣膜及冠状动脉的内膜或中膜, 是晚期动脉粥样硬化、慢性肾病、糖尿病和瓣膜病变等的典型病理表现^[1]。临床数据显示, 60%以上老年人的血管壁中可发现钙盐沉积, 且血管钙化与心血管疾病的死亡率密切相关^[2]。从解剖意义上, 根据钙、磷等矿物质在血管内沉积的部位, 可将动脉钙化分为内膜钙化(intimal vascular calcification)和中膜钙化(medial vascular calcification), 具体如表1所示。传统观点认为钙化是衰老过程中的一种退行性病变, 但越来越多的证据显示, 钙化的发生发展是一个主动的、且受到高度调控的复杂的生物学过程。机体内多种不

同细胞类型, 包括内皮细胞(endothelial cells, ECs)、平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)、周细胞、间充质干细胞和祖细胞等与促炎细胞因子、氧化应激和血流剪切应力等多种因素相互作用, 进而导致血管钙化的发生^[13~15]。该过程常常受到多种因素的调节, 如钙和磷酸盐的代谢稳态、氧化应激、自噬、炎症、细胞凋亡、矿物质的吸收、细胞衰老以及胞外囊泡的释放等^[16]。

近年来研究表明, 作为物质传输和胞间通讯的重要转运体, 外泌体(exosomes)与血管钙化密切相关^[8]。通过透射电子显微镜在钙化的主动脉瓣、动脉中膜以及动脉粥样硬化内膜斑块处均可观察到胞外囊泡的存在^[17]。Kapustin等人^[18]研究证实, 体内诱导平滑肌细胞

引用格式: 苏冠月, 汪小力, 裴童, 等. 外泌体调控血管钙化的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 973–982

Su G Y, Wang X L, Pei T, et al. Advances on vascular calcification mediated by exosomes (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 973–982, doi: 10.1360/SSV-2020-0108

表 1 血管钙化的类型及特征

Table 1 Classification and characteristics of vascular calcification

	中膜钙化	内膜钙化	参考文献
钙化位置	大、中动脉的平滑肌肌层	大血管和冠状动脉内膜层	[3]
分布特征	沿血管中膜和内弹力膜呈线状聚集	点灶状或斑片状	[4]
病理表现	血管僵硬、顺应性降低、管腔狭窄	内膜增生伴脂质沉积和巨噬细胞浸润	[5]
驱动因素	钙磷代谢紊乱; 氧化应激; 机械应力; 细胞凋亡; 衰老	炎症; 氧化应激; 机械应力;	[5,6]
始动环节	钙化囊泡释放, 为羟基磷灰石的形成提供成核位点		[7]
调控机制	基质囊泡; 外泌体; 自噬; OPG/RANK/RANKL信号通路; Notch信号通路; BMP信号通路; Wnt信号通路		[8~12]
相关疾病	糖尿病; 慢性肾病; 衰老; 骨质疏松	动脉粥样硬化(晚期)	[3,5,10]
临床并发症	高血压; 心力衰竭	动脉栓塞; 斑块破裂; 预后不良	[5,10]

释放外泌体也有助于促进血管钙化的发生, 其中, 细胞表型的转化与外泌体样囊泡释放增加密切相关。正常生理情况下, 平滑肌细胞呈现收缩样表型, 通过主动释放外泌体调节微环境稳态, 该外泌体中包含内源性钙化抑制因子, 如基质Gla蛋白(matrix GLA protein, MGP)、胎球蛋白A(fetuin A)等, 从而抑制血管钙化的发生; 但在炎症、钙磷代谢紊乱或机械应力等因素的刺激下, 平滑肌细胞转变为合成样表型, 外泌体释放增加, 并进一步转化为钙化外泌体(calcified exosomes), 通过与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的弹力蛋白和胶原纤维相互作用, 形成矿物质沉积和钙化灶^[18,19]。外泌体调节血管钙化涉及多个复杂的生物学过程, 包括外泌体的生成、释放、摄取以及矿物质在胞外的黏附和聚集等, 而该过程又是通过多种相互作用的机制实现的, 如鞘磷脂磷酸二酯酶3(sphingomyelin phosphodiesterase, SMPD3)^[20]、细胞骨架重构^[21]、Sortilin^[22]等。但是, 外泌体在血管钙化进程中的具体作用及机制尚不完全清楚, 仍有待进一步探索和研究。由于血管内皮细胞和平滑肌细胞是引起血管钙化的主要细胞, 本文就外泌体及其在内皮细胞及平滑肌细胞参与血管钙化中的作用及其可能的机制进行了综述, 以期对血管钙化的防治提供新思路。

1 外泌体的形成和特征

外泌体是细胞分泌的一种具有脂质双层膜结构, 且富含蛋白质、脂质和核酸等内容的微小膜泡, 直径大约为30~150 nm(平均直径约为100 nm)^[23], 是一类典型的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)。目前,

外泌体已被发现存在并分布于多种生物体液中, 包括血液、乳汁、唾液、尿液等, 携带和传递重要的信息分子, 是调控细胞间通讯的一种重要载体^[24]。本质上, 外泌体是多泡性核内体(multivesicular bodies, MVBs)与细胞质膜融合后释放到细胞外的一种膜泡。在外泌体形成过程中, 质膜首先向内凹陷形成核内体, 随后核内体限制膜再次发生多处内陷形成腔内小泡(intraluminal vesicles, ILVs), 最终形成成熟的MVBs, 当MVBs与细胞表面融合后, ILVs被释放到细胞外, 即为外泌体^[25]。无论在正常生理或病理状态下, 机体内几乎所有类型的细胞都能组成性或诱导性地产生并释放外泌体, 但不同来源细胞产生的外泌体或同种细胞在不同应激条件下产生的外泌体存在不均一性, 具有不同的生物学功能^[26]。这就说明外泌体是一个高度异质性的群体, 具有独特的诱导复杂生物学反应的能力, 而这种异质性主要取决于其大小、内容物、细胞来源以及对受体细胞的功能影响等。近年来研究表明, Ras相关蛋白GTPase Rab、肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)蛋白、凋亡相关基因2相互作用蛋白X(apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, Alix)、运输所需的核内体分选复合体(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)、syntenin1、syndecan-1、tetraspanins、神经酰胺和鞘磷脂酶等在外泌体的生成过程中均发挥重要作用, 但其具体的作用和调控机制仍有待进一步研究^[27]。

外泌体是细胞外重要的生物信息载体, 常携带mRNA、microRNA(miR)、DNA片段、功能蛋白、转录因子等多种生物活性物质, 其膜上也可表达多种抗原、抗体分子(如CD81, CD63, TSG101和Alix等)^[27]。

不同类型的细胞将外泌体释放到体液和各种微环境中, 外泌体通过体液循环将多种功能的转录产物和脂质传递到靶细胞, 并在邻近区域或远处细胞中发挥作用, 进而调控其分子和表型发生改变. 目前认为, 靶细胞摄入外泌体的机制主要包括3种: (i) 外泌体被内吞或内化到内吞小室, 通过反向融合将其内容物释放到受体细胞的胞质中, 此后, 外泌体可与核内体膜融合或被靶向溶酶体降解; (ii) 受体-配体相互作用; (iii) 外泌体膜与细胞质膜融合, 内容物直接释放到受体细胞的胞质中^[24]. 据此, 外泌体传递到受体细胞的蛋白质、代谢物和核酸等可有效地调节受体细胞的生物学效应, 维持机体正常的生命活动. 众多研究显示, 外泌体不仅参与调节生殖、妊娠以及胚胎发育等生理学过程, 在感染、心血管疾病、神经退行性疾病及肿瘤等多种病理性过程的进展中也发挥十分重要的作用^[27]. 外泌体向靶细胞转运功能性内容物的特性使得其不仅可以作为疾病诊断和预后的指标, 还有望成为靶向治疗的重要载体.

2 外泌体在血管钙化中的作用

近年来研究发现, 血管钙化是类似于骨形成的一个复杂的、活跃的、受到高度调控的生物学过程^[28], 其可能的致病机制包括血管平滑肌细胞的表型转化、钙和磷酸盐沉积、弹性蛋白降解、细胞自噬和凋亡等. 最新证据表明, 当钙化激活因子和抑制因子失去平衡时, 外泌体的释放也是促进VC发生的重要调控机制^[29]. Kapustin等人^[18]在慢性肾病患者的动脉中发现了外泌体, 并观察到CD63(外泌体的生物标志物)与钙化共定位, 提示外泌体参与调节血管钙化的进程. Chen等人^[30]体外研究也证实SMCs释放的外泌体可以促进钙化的发生, 并伴随着MEK1, Erk1/2, Nox1, SOD2蛋白表达上调及胞内钙离子浓度的增加. 外泌体主要通过传递蛋白质、microRNAs等信息调控SMCs的表型转化, 促进矿物质沉积位点的形成, 进而参与VC的进程^[8,31]. 其中, SMCs的成骨样表型转化是血管钙化进程的关键事件, 常伴随着调控骨和软骨形成的相关转录因子表达上调以及平滑肌标志物的丢失^[32]. 正常生理情况下, 血管壁局部和循环外泌体中的钙化抑制因子, 如fetuin A、MGP、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和骨形态发生蛋白-7(bone morpho-

genetic protein-7, BMP-7)等, 可防止钙化的发生^[33]. 但在病理因素的刺激下, 如机械损伤、氧化应激、细胞凋亡或磷酸盐代谢紊乱, 血管壁及外泌体中的钙化抑制因子丢失, 成骨样分化的相关因子, 如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等开始形成和激活, 促使细胞向成骨样/软骨样表型转化, 呈现与成骨细胞相关的特征, 进而促进血管钙化的发生^[34,35].

矿物沉积过程中, 将SMCs分泌的外泌体与骨细胞分泌的基质囊泡(matrix vesicles, MVs)进行比较, 可发现二者在大小、形态和脂质/蛋白含量上差异甚小, 且均具有富集钙离子和磷酸盐并为其转化为羟基磷灰石提供场所的特性^[18], 说明该外泌体与MV在钙化过程中具有相同的特征. 人们将SMCs释放的具有钙化潜能的囊泡称为钙化外泌体, 但其与MV的具体差别目前尚不十分明确, 仍有待进一步探索. 研究表明, 钙化外泌体可作为钙磷晶体在主动脉壁沉积的成核剂, 在平滑肌细胞的表型转化和钙化中发挥十分重要的作用^[29]. 一方面, 外泌体可以通过受体-配体相互作用与靶细胞表面的膜蛋白结合, 激活细胞内的信号通路调控血管钙化; 另一方面, 它还可以直接与靶细胞的膜进行融合, 从而释放出内容物, 调控钙化的发生^[36].

血管内皮细胞和平滑肌细胞是构成血管壁的主要细胞成分, 具有控制血流和维持血管张力的作用, 其结构和功能变化是调控血管钙化发生的重要细胞病理学基础. 在血管钙化的进展过程中, 外泌体被证实参与调节平滑肌细胞的表型转化、钙磷沉积、凋亡和自噬以及内皮细胞炎症、内皮-间充质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)等生物学过程^[24,29,37]. 当机体出现组织代谢紊乱或损伤等情况时, 内皮细胞和平滑肌细胞可以感受到这些刺激, 并通过释放和摄取外泌体调控表型转化、细胞凋亡、自噬等创造一种局部促钙化的环境, 增加钙磷酸盐在血管壁内的沉积, 进而导致血管钙化的发生^[34].

3 外泌体调控SMCs参与血管钙化

平滑肌细胞是血管中膜的主要细胞类型, 也是参与调控血管钙化的主要细胞来源. 在健康动脉中, SMCs位于血管中膜, 呈长梭状, 可以表达特异性的收

缩蛋白,如 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SMMHC)、平滑肌22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α)等,参与形成肌丝,维持血管弹性和收缩功能;另外,SMCs可以分泌弹性蛋白、胶原蛋白、蛋白多糖等大分子,调控细胞外基质的形成^[38]。

3.1 外泌体促进SMCs发生表型转化

平滑肌细胞的表型转化是血管钙化发生发展过程中的关键环节。对人的钙化血管进行组织学分析可以发现,OPN、核心结合因子 α 1(core binding factor α 1, Cbfa1)、Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)等成骨分化相关的标志蛋白显著高表达^[39,40]。此外,在动脉粥样硬化进程中,内皮细胞损伤后释放的炎症因子及血流动力学的变化均可刺激平滑肌细胞发生去分化,由稳定的收缩表型向合成表型发生转变,从而使其获得更强的迁移和增殖能力,进而穿过内弹力膜进入内膜层,促进斑块的形成^[41],同时伴随着骨分化相关基因,如ALP, BMP-2, Runx2, OPN, MGP等表达的上调。通过电子显微镜对提取自载脂蛋白E敲除小鼠的动脉粥样硬化斑块中的EVs进行观察,可发现针状的羟基磷灰石纳米晶体^[42]。高分辨率的显微计算机断层成像结果也显示,动脉粥样硬化斑块纤维帽的微钙化灶中存在钙化外泌体的聚集^[43]。这些结果表明,外泌体参与调节心血管钙化的形成和发展,且可能与血管SMCs的成骨样表型转化密切相关。

在SMCs表型调控过程中,外泌体可以作为一种特异的信号转载体参与调节细胞增殖、迁移、凋亡、钙化和分化等^[44]。Sortilin是一种调控平滑肌细胞发生钙化的关键转运因子,常见于人钙化血管及鼠动脉粥样硬化斑块中,可通过调节EVs对钙化蛋白相关组织非特异性碱性磷酸酶(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP)的负荷,使其转化为具有钙化潜力的囊泡,参与微钙化的形成^[22]。钙化的EVs中含有功能失调的microRNAs,可诱导Runx2, TNAP, Smad1, Osterix和促炎因子等成骨标志物的基因表达^[45]。SMPD3是参与外泌体生成的调控因子,研究证实,体外诱导钙化过程中,抑制SMPD3会阻碍外泌体的产生及钙化的形成。Kapustin和Shanahan^[19]研究发现,SMCs收缩表型标志物的表达与外泌体的分泌通常呈负相关,血小板来源

的生长因子BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)可以降低平滑肌细胞收缩表型标志物的表达,促进外泌体的分泌,且很有可能是依赖于SMPD3信号通路调控的。乳脂肪球表皮生长因子8(milk fat globule-EGF factor 8, MFG8)是淀粉样蛋白的前体,常在老年血管主动脉中膜形成淀粉样蛋白,也是一种年龄相关蛋白,SMCs释放的富含MFG8的外泌体会随着年龄的增加而增多。Whitehead等人^[46]研究结果显示,MFG8可通过ERK信号通路诱导平滑肌细胞转化为成骨样表型,促进钙化的发生。

3.2 外泌体调控矿物质沉积

众多研究表明,外泌体可以作为钙磷等矿物质的矿化位点参与血管钙化的发生^[20]。高磷酸盐或钙离子环境已被证实可以促进血管钙化的发生^[47]。将SMCs置于高磷酸盐培养基中培养时,平滑肌细胞中收缩型标志物 α -SMA, SM22和SMMHC表达水平降低,而成骨相关标志物OPN、I型胶原蛋白(collagen I, Coll)、OCN表达升高,细胞中钙离子浓度升高,且呈现时间依赖性^[48]。一方面,高磷酸盐刺激可以通过增加SMCs中Cbfa1的表达直接诱导SMCs向成骨细胞表型转化^[49]。另一方面,高磷酸盐会抑制钙化抑制因子的产生,促进胞外囊泡的释放,且伴随着促钙化因子表达水平的增加^[34]。

囊泡释放通常被认为是一种适应性反应。囊泡可以将多余的钙从细胞中排出,为防止胞内钙超载提供保护。但随着时间的推移,EVs随着钙化抑制因子的丢失而转变为钙化EVs,促进钙化灶的形成^[34]。当胞内钙离子含量过高时,外泌体可以摄取钙磷等矿物质复合物以维持细胞内矿物质代谢的稳态,同时也进一步加剧了矿物沉积位点的形成。富含Gla的蛋白(Gla-rich protein, GRP)可以通过与外部的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)结合,抑制外泌体表面成核位点的形成^[31]。血管钙化过程中分泌的钙化外泌体中MGP含量少,而羟基磷灰石含量高,这也是导致矿物质沉积形成微钙化的始动因素^[18]。由于钙化外泌体中所含Fetuin-A及GRP浓度较低,当其释放到ECM上时,容易在胶原稀疏的区域聚集形成微钙化。除了外泌体内的矿物质,外部的PS也可以通过与钙离子结合蛋白,如Annexin A2, A5, A6等结合,从而在外泌体膜内侧或外侧形成羟基磷灰石结晶^[50]。据此可以通过抑制矿物质结

合的能力来阻断依赖于外泌体的钙沉积, 改善钙化进程.

3.3 外泌体介导microRNA转运

不同来源的外泌体可以通过将microRNAs转运到受体血管平滑肌细胞参与调节血管钙化^[51]. Cui等人^[52]研究发现, 矿化的成骨细胞前体细胞MC3T3-E1释放的外泌体有助于促进ST2细胞的成骨分化, 且是由外泌体microRNAs形成的复杂网络所介导. 外泌体内microRNAs的改变可以通过促进Runx2的表达, 激活Wnt/ β -catenin等相关信号通路调控细胞的成骨分化. 研究表明, 在VC过程中表达升高的microRNAs可以通过靶向抗钙化蛋白或收缩型标志物促进血管SMCs成骨样转化, 而表达降低的microRNAs则会通过靶向成骨转录因子抑制SMCs的成骨样转化^[8]. Kapustin等人^[18]发现, 血管SMCs来源的外泌体中富含miR-143和调节细胞黏附和迁移的蛋白, 可通过自分泌和旁分泌的方式参与调节细胞增殖和迁移. miR-233已被证实可以使平滑肌细胞由收缩型向合成型转化, 促进血管钙化^[53]. 类似作用的microRNAs还有miR-712, miR-714及miR-762等^[54]. 相反, miR-26a抑制平滑肌细胞分化, 且通过靶向SMAD1和SMAD4调控其表型转换^[55]. 类似作用的microRNAs还有miR-29a/b, miR-125b等^[54].

众多研究表明, 内皮细胞与平滑肌细胞之间的相互作用在维持血管壁稳态中发挥着关键作用, 而外泌体则是正常和病理条件下实现细胞间相互作用和信息传递的重要载体. 一方面, 平滑肌细胞释放的外泌体参与调节内皮细胞黏附、迁移和自噬等. X-box binding protein 1(XBP1)是调节细胞功能的一种重要结合蛋白, Zhao等人^[56]的体外实验结果显示, 将XBP1作用于血管SMCs可以调节血管ECs的迁移, 主要是由于SMCs释放的EVs可以介导miR-150转移, miR-150通过驱动VEGF-A/VEGFR/PI3K/Akt信号通路调控内皮细胞迁移, 进而维持血管壁稳态. Lombardo等人^[57]发现, 源自人主动脉平滑肌细胞外泌体的miR-221/222可以通过PTEN/Akt信号通路抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)发生自噬. 另一方面, 内皮细胞中富含microRNAs的外泌体可以调节SMCs的基因表达和表型转变. Hergenreider等人^[58]发现, 在流体剪切力作用下, 内皮细胞释放的富含miR-143/145的外泌体可以被平滑肌细胞所摄取, 进而

抑制平滑肌细胞的表型转化, 阻碍血管钙化的发生.

3.4 其他

自噬是维持细胞代谢和内环境稳态的关键调节因素, 在维持正常的血管细胞功能方面起着十分重要的作用. 近年来研究表明, 适当增强细胞自噬能力有助于抑制平滑肌细胞发生钙化. Dai等人^[12]认为, 自噬可能是一种内源性保护机制, 通过减少钙化囊泡的释放来对抗高磷酸盐诱导的血管钙化. 研究发现, 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)可以显著促进高磷诱导的钙化外泌体的释放, 增强ALP的活性, 使平滑肌细胞中的钙盐沉积增加, 而自噬诱导剂丙戊酸(valproic acid)却可以减少钙化的发生. Xu等人^[59]研究表明, miR-30b表达上调可以降低SOX9的表达, 抑制mTOR信号通路, 促进基质金属蛋白酶的表达和自噬的发生, 从而抑制血管钙化. 此外, Wei等人^[60]研究发现, 激活KEAP1/NRF2/P62信号通路可以通过抑制氧化应激反应中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生降低高磷酸盐诱导的平滑肌细胞钙化. 诱导SMCs发生复制性衰老后, 其释放的外泌体增多, 细胞中出现明显钙化且成骨相关基因ALP, *Coll*, *Runx2*表达显著上调, 并发生成骨样转化, 且该过程可能受到AMPK/TSC2/mTOR/S6K1信号通路的调控^[61,62].

4 外泌体调控ECs发生内皮-间充质转化

通过对主动脉钙化病变的谱系追踪, 证实了主动脉粥样硬化斑块钙化灶中存在内皮细胞起源的细胞, 说明血管内皮细胞也可能直接参与了钙化过程^[63]. 研究人员利用基于Tie-2的内皮细胞谱系追踪技术对患者来源组织进行活检发现, 多达50%的进展性骨化中形成的异位骨具有内皮细胞来源, 提示内皮细胞可能向成骨细胞发生转化^[64]. 最近的研究表明, EndMT参与调控主动脉和瓣膜内钙化的形成, 被认为是一种ECs参与血管钙化的新机制^[14,65,66]. 在病理因素的刺激下, ECs发生EndMT转变为具有成骨潜能的细胞, 伴随着内皮功能的下调和成纤维细胞样表型的获得, 进而促进血管钙化^[67-69]. 其中, EndMT通常与干细胞样特性的增加有关, 提示在骨/软骨分化之前, ECs发生了一定程度的去分化, 而不是直接从内皮细胞向成骨细胞转化^[70,71].

EndMT被认为是内皮细胞向间充质细胞转化并获得多能性的过程. EndMT被激活后, 其效应因子通过与启动子区域的特定元件相互作用, 调控内皮细胞和间充质细胞特异性基因的表达, 引起内皮细胞标志物(如血管E-钙黏蛋白(vascular E-cadherin, E-cad)和CD31)的表达减少, 而间充质标志物(如 α -SMA、N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-cad)和纤连蛋白(fibronectin, FN))的表达增加, 并且伴随着细胞-细胞连接和细胞极性的丧失, 细胞形态由铺路石样变为纺锤状, 获得迁移和侵袭表型, 大量分泌ECM, 最终导致内皮细胞来源的间充质细胞脱层并向内皮下层组织迁移. 大量研究表明, 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的几个成员, 如TGF- β 和BMPs是EndMT的重要调控因子^[72]. 缺氧、糖尿病等因素可诱导内皮细胞释放富含缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和TGF- β 的外泌体, 然后通过HIF-1 α 的靶基因*SNAIL*, TGF/SMAD信号通路以及DNMT3a调节的Ras-Gap-like protein 1(RASAL1)启动子的超甲基化促进内皮细胞发生EndMT^[73]. 另外, 有研究显示, 机械牵张力可以促进外泌体的分泌, 通过增加Runx2表达和ALP活性促进主动脉瓣钙化^[74]. 研究表明, BMPs信号可以促进血管钙化, 抑制血管细胞中的BMPs信号能够显著降低动脉粥样硬化病变钙化^[75]. BMP2和

BMP4对钙化相关的病理刺激, 如血流紊乱、氧化应激、炎症和高血糖等高度敏感, 其中激活的BMP2常见于血管中层, 而激活的BMP4则多见于内皮层^[76,77]. Csiszar等人^[78]发现, 剪切应力作用下, 内皮细胞中BMP4表达下调. Medici等人^[64]的研究显示, 稳定表达突变受体的ECs可响应TGF- β 2或BMP4刺激发生EndMT, 进一步向成骨/软骨表型分化. 据此, 可以推断EndMT是内皮细胞参与血管钙化发生发展的重要机制, 而该过程通常会受到外泌体中BMPs、转化生长因子及其他一些信号分子的调控.

5 展望

综上, 血管钙化是一个复杂的、活跃的、受到高度调控的生物学过程, 且该过程受到外泌体的调节. 一方面, 外泌体可以通过转运microRNAs等信息物质促进平滑肌细胞发生成骨样表型转化、钙磷等矿物质沉积以及细胞自噬等; 另一方面, 外泌体还可以通过诱导内皮细胞发生内皮-间充质转化, 进而调控矿物质的沉积以及血管钙化(图1). 因此, 深入了解外泌体的特征及其在血管钙化中的作用, 不仅对血管生物学的发展具有重要意义, 也有望为临床诊断和治疗血管钙化提供新的思路和靶点.

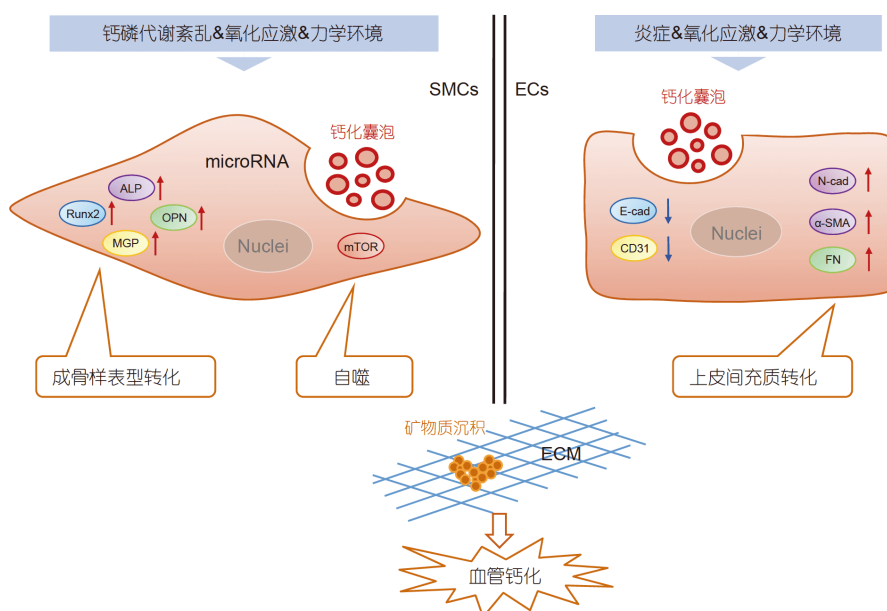


图1 外泌体调控平滑肌细胞和内皮细胞参与血管钙化

Figure 1 SMCs and ECs participate in vascular calcification via exosomes

参考文献

- 1 Patel J J, Bourne L E, Davies B K, et al. Differing calcification processes in cultured vascular smooth muscle cells and osteoblasts. *Exp Cell Res*, 2019, 380: 100–113
- 2 Hsu J J, Lim J, Tintut Y, et al. Cell-matrix mechanics and pattern formation in inflammatory cardiovascular calcification. *Heart*, 2016, 102: 1710–1715
- 3 Andrews J, Psaltis P J, Bartolo B A D, et al. Coronary arterial calcification: A review of mechanisms, promoters and imaging. *Trends Cardiovasc Med*, 2018, 28: 491–501
- 4 Stary H C. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol*, 2000, 89: S028–S035
- 5 Durham A L, Speer M Y, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 590–600
- 6 Pescatore L A, Gamarra L F, Liberman M. Multifaceted mechanisms of vascular calcification in aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39: 1307–1316
- 7 Anderson H C. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*, 2003, 5: 222–226
- 8 Zhang C, Zhang K, Huang F, et al. Exosomes, the message transporters in vascular calcification. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4024–4033
- 9 Boström K I. Where do we stand on vascular calcification? *Vasc Pharmacol*, 2016, 84: 8–14
- 10 Wu M, Rementer C, Giachelli C M. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93: 365–373
- 11 Chen B, Zhao Y, Han D, et al. Wnt1 inhibits vascular smooth muscle cell calcification by promoting ANKH expression. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 135: 10–21
- 12 Dai X Y, Zhao M M, Cai Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney Int*, 2013, 83: 1042–1051
- 13 Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011, 473: 317–325
- 14 Boström K I, Yao J, Guihard P J, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerotic lesion calcification. *Atherosclerosis*, 2016, 253: 124–127
- 15 Hortells L, Sur S, St. Hilaire C. Cell phenotype transitions in cardiovascular calcification. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 27
- 16 Rogers M A, Aikawa E. Cardiovascular calcification: artificial intelligence and big data accelerate mechanistic discovery. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16: 261–274
- 17 Krohn J B, Hutcheson J D, Martínez-Martínez E, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms. *J Physiol*, 2016, 594: 2895–2903
- 18 Kapustin A N, Chatrou M L L, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*, 2015, 116: 1312–1323
- 19 Kapustin A N, Shanahan C M. Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation. *J Physiol*, 2016, 594: 2905–2914
- 20 Kapustin A N, Davies J D, Reynolds J L, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res*, 2011, 109: e1–12
- 21 Chaudhary S C, Kuzynski M, Bottini M, et al. Phosphate induces formation of matrix vesicles during odontoblast-initiated mineralization *in vitro*. *Matrix Biol*, 2016, 52–54: 284–300
- 22 Goettsch C, Hutcheson J D, Aikawa M, et al. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1323–1336
- 23 Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: Fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78: 67–83
- 24 Wang Y, Xie Y, Zhang A, et al. Exosomes: An emerging factor in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108951
- 25 van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 213–228
- 26 Pegtel D M, Gould S J. Exosomes. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514
- 27 Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367: eaau6977
- 28 Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*, 2014, 35: 1515–1525

- 29 Yang W, Zou B, Hou Y, et al. Extracellular vesicles in vascular calcification. *Clin Chim Acta*, 2019, 499: 118–122
- 30 Chen N X, O'Neill K D, Moe S M. Matrix vesicles induce calcification of recipient vascular smooth muscle cells through multiple signaling pathways. *Kidney Int*, 2018, 93: 343–354
- 31 Kapustin A N, Schoppet M, Schurgers L J, et al. Prothrombin loading of vascular smooth muscle cell-derived exosomes regulates coagulation and calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37: e22
- 32 Balogh E, Tóth A, Méhes G, et al. Hypoxia triggers osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in an HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1)-dependent and reactive oxygen species-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39: 1088–1099
- 33 Touyz R M, Montezano A C. Vascular smooth muscle cells sense calcium: a new paradigm in vascular calcification. *Cardiovascular Res*, 2009, 81: 237–239
- 34 Voelkl J, Lang F, Eckardt K U, et al. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 2077–2091
- 35 Ponnusamy A, Sinha S, Hyde G D, et al. FTI-277 inhibits smooth muscle cell calcification by up-regulating PI3K/Akt signaling and inhibiting apoptosis. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0196232
- 36 Goettsch C, Hutcheson J D, Aikawa E. MicroRNA in cardiovascular calcification. *Circ Res*, 2013, 112: 1073–1084
- 37 Vanhaverbeke M, Gal D, Holvoet P. Functional role of cardiovascular exosomes in myocardial injury and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 998: 45–58
- 38 Basatemur G L, Jørgensen H F, Clarke M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16: 727–744
- 39 Moe S M, Duan D, Doehle B P, et al. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*, 2003, 63: 1003–1011
- 40 Tyson K L, Reynolds J L, McNair R, et al. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 489–494
- 41 Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, et al. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 540–550
- 42 Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J L, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging *in vivo*. *Circulation*, 2007, 116: 2841–2850
- 43 Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, et al. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 10741–10746
- 44 Maegdefessel L, Rayner K J, Leeper N J. MicroRNA regulation of vascular smooth muscle function and phenotype: early career committee contribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35: 2–6
- 45 Bakhshian Nik A, Hutcheson J D, Aikawa E. Extracellular vesicles as mediators of cardiovascular calcification. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 78
- 46 Whitehead M, Ahmad S, Shanahan C. Role of vascular smooth muscle cell derived-exosomes in age-related vascular amyloidosis. *Heart*, 2018, 104: A96
- 47 Ciceri P, Falleni M, Tosi D, et al. High-phosphate induced vascular calcification is reduced by iron citrate through inhibition of extracellular matrix osteo-chondrogenic shift in VSMCs. *Int J Cardiol*, 2019, 297: 94–103
- 48 Wang C, Xu W, An J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates vascular calcification by upregulating Runx2. *Nat Commun*, 2019, 10: 1203
- 49 Crouthamel M H, Lau W L, Leaf E M, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 2625–2632
- 50 Bobryshev Y V, Killingsworth M C, Huynh T G, et al. Are calcifying matrix vesicles in atherosclerotic lesions of cellular origin? *Basic Res Cardiol*, 2007, 102: 133–143
- 51 Gui T, Zhou G, Sun Y, et al. MicroRNAs that target Ca²⁺ transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. *Lab Invest*, 2012, 92: 1250–1259
- 52 Cui Y, Luan J, Li H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett*, 2016, 590: 185–192
- 53 Rangrez A Y, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, et al. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS ONE*, 2012, 7: e47807

- 54 Ni Y Q, Lin X, Zhan J K, et al. Roles and functions of exosomal non-coding RNAs in vascular aging. *Aging Dis*, 2020, 11: 164–178
- 55 Yang X, Dong M, Wen H, et al. MiR-26a contributes to the PDGF-BB-induced phenotypic switch of vascular smooth muscle cells by suppressing Smad1. *Oncotarget*, 2017, 8: 75844–75853
- 56 Zhao Y, Li Y, Luo P, et al. XBP1 splicing triggers miR-150 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells via extracellular vesicles. *Sci Rep*, 2016, 6: 28627
- 57 Lombardo G, Dentelli P, Togliatto G, et al. Activated Stat5 trafficking via endothelial cell-derived extracellular vesicles controls IL-3 pro-angiogenic paracrine action. *Sci Rep*, 2016, 6: 25689
- 58 Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 249–256
- 59 Xu T H, Qiu X B, Sheng Z T, et al. Restoration of microRNA-30b expression alleviates vascular calcification through the mTOR signaling pathway and autophagy. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 14306–14318
- 60 Wei R, Enaka M, Muragaki Y. Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production. *Sci Rep*, 2019, 9: 10366
- 61 Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, et al. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H1673–H1684
- 62 Zhan J K, Wang Y J, Li S, et al. AMPK/TSC2/mTOR pathway regulates replicative senescence of human vascular smooth muscle cells. *Exp Ther Med*, 2018, 16: 4853–4858
- 63 Guihard P J, Yao J, Blazquez-Medela A M, et al. Endothelial-mesenchymal transition in vascular calcification of Ins2Akita/+ mice. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0167936
- 64 Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial–mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J*, 2011, 437: 515–520
- 65 Sánchez-Duffhues G, García de Vinuesa A, Ten Dijke P. Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases: Developmental signaling pathways gone awry. *Dev Dyn*, 2018, 247: 492–508
- 66 Sánchez-Duffhues G, García de Vinuesa A, van de Pol V, et al. Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2. *J Pathol*, 2019, 247: 333–346
- 67 Souilhol C, Harmsen M C, Evans P C, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 565–577
- 68 Evrard S M, Lecce L, Michelis K C, et al. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*, 2016, 7: 11853
- 69 Sánchez-Duffhues G, de Vinuesa A G, Lindeman J H, et al. SLUG is expressed in endothelial cells lacking primary cilia to promote cellular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35: 616–627
- 70 Yao Y, Jumabay M, Ly A, et al. A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res*, 2013, 113: 495–504
- 71 Li Y, Lui K O, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15: 445–456
- 72 Salazar V S, Gamer L W, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12: 203–221
- 73 Xu X, Tan X, Hulshoff M S, et al. Hypoxia-induced endothelial-mesenchymal transition is associated with RASAL1 promoter hypermethylation in human coronary endothelial cells. *FEBS Lett*, 2016, 590: 1222–1233
- 74 Balachandran K, Sucusky P, Jo H, et al. Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenetic protein-dependent manner. *Am J Pathol*, 2010, 177: 49–57
- 75 Bardeesi A S A, Gao J, Zhang K, et al. A novel role of cellular interactions in vascular calcification. *J Transl Med*, 2017, 15: 95
- 76 Derwall M, Malhotra R, Lai C S, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 613–622
- 77 Boström K I, Rajamannan N M, Towler D A. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*, 2011, 109: 564–577
- 78 Csiszar A, Labinskyy N, Smith K E, et al. Downregulation of bone morphogenetic protein 4 expression in coronary arterial endothelial cells: role of shear stress and the cAMP/protein kinase A pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 776–782

Advances on vascular calcification mediated by exosomes

SU GuanYue, WANG XiaoLi, PEI Tong, YANG Fan, LIU XiaoHeng & SHEN Yang

Institute of Biomedical Engineering, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Vascular calcification (VC) is the ectopic deposition of calcium and phosphate in the vessel walls. VC has been determined to be an active and highly regulated biological process, which is generally influenced by abnormal mineral metabolism, oxidative stress, mechanical stress and inflammation. Serving as an important transporter in intercellular communication, exosomes are highly associated with vascular calcification. During the process of vascular calcification, exosomes can not only promote the osteogenic transformation and mineral deposition of vascular smooth muscle cells (SMCs) via transporting proteins and microRNAs, but also induce the endothelial-mesenchymal transition (EndMT) of vascular endothelial cells (ECs). However, the specific roles and underlying mechanisms of exosomes in VC are still unclear. In this review, we focus on the effects of exosomes on osteogenic phenotypic transformation, mineral deposition and transportation of microRNAs in SMCs, and EndMT in ECs, which may provide a novel therapeutic target for vascular calcification.

vascular calcification, exosomes, smooth muscle cells, endothelial cells, phenotypic transformation

doi: [10.1360/SSV-2020-0108](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0108)