

血管钙化对血管组织内皮素表达的影响

吴胜英¹, 张宝红¹, 蒋宏峰¹, 潘春水¹, 庞永政¹, 唐朝枢^{1,2}, 齐永芬²

(1. 北京大学第一医院心血管研究所, 北京市 100034; 2. 北京大学医学部生理与病理生理学系, 北京市 100083)

[关键词] 病理生理学; 血管钙化与内皮素的关系; 逆转录聚合酶链反应; 血管钙化; 血管平滑肌细胞; 内皮素; 大鼠

[摘要] 通过观察血管钙化大鼠血管组织和钙化血管平滑肌细胞内皮素含量的变化, 探讨血管钙化对血管组织内皮素表达的影响。用维生素 D₃ 加尼古丁诱导大鼠血管钙化模型, β 磷酸甘油制备钙化血管平滑肌细胞, 采用 Von Kossa 染色、钙含量测定、⁴⁵Ca 聚集及碱性磷酸酶活性测定判断钙化程度, 放射免疫分析法测定血浆、血管和血管平滑肌细胞培养基中内皮素含量, 用竞争性定量逆转录聚合酶链反应方法测定血管和血管平滑肌细胞中内皮素 mRNA 水平。结果发现: 钙化血管平滑肌细胞 Von Kossa 染色见有大量黑色颗粒沉积, 钙化细胞的钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 摄入及碱性磷酸酶活性分别较正常平滑肌细胞增加 118%、174% 和 7 倍 (P 均 < 0.01); 钙化细胞培养基中内皮素含量较对照组增加 35% ($P < 0.05$), 内皮素 mRNA 水平较对照组高 120% ($P < 0.05$); 钙化组大鼠血管组织 Von Kossa 染色见血管中层有大量黑色颗粒沉积, 主动脉钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 沉积及碱性磷酸酶活性分别较对照组高 5.0 倍、1.4 倍和 1.4 倍 (P 均 < 0.01); 钙化大鼠血浆和血管内皮素含量分别较对照组增加 102% 和 103% (P 均 < 0.01); 钙化血管内皮素 mRNA 水平较正常对照组高 22% ($P < 0.01$); 波生坦处理的大鼠血管钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 聚集及碱性磷酸酶活性较单纯钙化组分别降低 33%、37%、40% (P 均 < 0.01)。结果表明钙化的血管和血管平滑肌细胞内皮素分泌增加, 内皮素基因表达亦明显上调, 内皮素受体阻断剂波生坦可减轻血管钙化程度, 提示内皮素在血管钙化发病中具有一定的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Vascular Calcification on Endothelin Expression in Vessel

WU Sheng-Ying¹, ZHANG Bao-Hong¹, JIANG Hong-Feng¹, PAN Chur-Shui¹, PANG Yong-Zheng¹, TANG Chao-Shu^{1,2}, and QI Yong-Fen²

(1. Institute of Cardiovascular Research, Peking University First Hospital, Beijing 100034; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Vessel Calcification; Vascular Smooth Muscle Cell; Endothelin; Rats; Vitamin D₃; mRNA

[ABSTRACT] **Aim** To observe the change of endothelin content and to explore the effects of vascular calcification on endothelin expression on the model of vascular calcification in rats induced by vitamin D₃ plus nicotine and calcified vascular smooth muscle cells induced by β -glycerophosphate. **Methods** Arterial calcification of Sprague-Dawley rats was induced by vitamin D₃ plus nicotine (VDN). Calcification of cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) was prepared by incubation with β -glycerophosphate. Calcification was confirmed by Von Kossa staining, measurement of calcium content, ⁴⁵Ca²⁺ accumulation and alkaline phosphatase (ALP) activity of intracellular and vascular tissue. Endothelin levels in the plasma, vascular tissue and medium were measured by using radioimmunoassay. Endothelin mRNA level was determined by using competitive quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** The results showed that the content of calcium, ⁴⁵Ca²⁺ uptake and alkaline phosphatases activity in calcified VSMCs were increased by 118%, 174% and 7-fold respectively (all $P < 0.01$), compared with control VSMCs. Content of endothelin in medium was increased by 35% ($P < 0.01$). It was found that the amount of endothelin mRNA was elevated by 120% ($P < 0.01$) compared with control. The calcium content, ⁴⁵Ca²⁺ accumulation and ALP activity in calcified arteries were increased by 5.0-fold, 1.4-fold and 1.4-fold respectively ($P < 0.01$), compared with control. Furthermore, it was showed that endothelin I levels in plasma and arteries tissues increased 102% and 103% respectively, compared with control ($P < 0.01$). The amount of endothelin mRNA in calcified aorta was elevated by 22% ($P < 0.01$) compared with control. However, the content of calcium, ⁴⁵Ca²⁺ uptake and ALP activity in VDN plus endothelin receptor inhibitor groups were decreased by 33%, 36.7% and 40.4% respectively ($P < 0.01$), compared with VDN group alone. **Conclud**

[收稿日期] 2002-12-26 [修回日期] 2003-04-29

[基金项目] 国家重大基础研究发展规划项目(973)(G2000056905)、国家教育部特殊教育发展基金(985)资助

[作者简介] 吴胜英, 女, 1966 年出生, 湖北省郧阳市人, 讲师, 湖北十堰市郧阳医学院病理生理学系, E-mail: wushengying@163.com。唐朝枢, 男, 1945 年出生, 重庆市人, 教授, 博士研究生导师, “973”首席科学家, 长期从事心血管疾病发病和防治的基础研究及心血管活性肽的研究。齐永芬, 女, 1964 年出生, 湖南省澧县人, 医学博士, 主要从事心血管疾病发病机制及心血管活性肽的研究, E-mail: yongfenqi@163.com, Tel: 010-62092183, 010-62092851。

sions These results showed that in calcified artery and VSMCs the production of endothelin was increased, and the gene expression of endothelin was up regulated. The Bosentan (inhibitor of endothelin receptor) significantly reduced the vascular calcification. These results suggested that endothelin could play a role in the pathogenesis of vascular calcification.

高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、肾病性血管病变及血管损伤、老化等病理过程中常存在不同程度的血管组织钙化现象,钙化血管舒张功能降低、僵硬性增加,往往导致血栓形成和动脉粥样斑块破裂等严重后果。血管钙化是心血管疾病的重要危险因素^[1,2],钙化致血管功能损伤的机制目前尚未完全阐明。既往认为血管钙化是钙、磷代谢紊乱使得钙盐在细胞内和组织间被动沉积的结果,是疾病过程或老化或退行性变化的伴发现象。近年越来越多的证据表明,血管钙化是类似骨发育和骨质疏松形成的主动调节过程^[3,4],主要特征是血管壁的细胞、尤其是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)发生骨样变化的主动调节过程,出现基质小泡,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性升高,及细胞外非胶原基质蛋白如骨桥蛋白、基质 Gla 蛋白等成骨样细胞表型的特征^[3,5]。心血管组织的一个重要特征是合成和分泌大量活性因子,通过旁/自分泌方式参与循环系统稳态调节。血管钙化时心血管组织及血管细胞旁/自分泌功能的变化,及其这些变化在血管钙化发生和发展中的意义,目前均不清楚。内皮素是血管内皮细胞和 VSMC 生成的由 21 个氨基酸残基组成的活性多肽,具有强的收缩血管、促进 VSMC 增生肥大、促进细胞外基质合成和促进粘附分子的释放及表达等多种生物学效应^[6]。内皮素在动脉粥样硬化、高血压和心衰等心血管疾病发病中起着重要作用,是影响循环系统功能稳态的重要调节因子之一。但是内皮素在心血管组织钙化发生中的作用目前尚不清楚。本工作在维生素 D₃(Vitamin D₃)、尼古丁诱导的大鼠血管钙化模型和 β-磷酸甘油诱导的培养大鼠 VSMC 钙化模型上,观察血管和内皮素的生成及基因表达的变化,以探讨内皮素在血管钙化发病中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,由北京大学医学部动物中心提供;所有动物实验程序按北京大学第一医院动物伦理委员会批准的动物实验标准进行。波生坦、内皮素放射免疫试剂盒购于美国凤凰公司;维生素 D₃、尼古丁、碱性磷酸酶试剂盒购于 Sigma 公司;⁴⁵ CaCl₂ 购自美国 New England Nuclear 公司,比活度为

18.373 Ci/g;余为市售分析纯产品。6 个多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由赛百盛公司合成。内皮素引物:内皮素 S(5'-GGT CTT GAT GCT GTT GCT GA-3'),内皮素 A(5'-GAG CTG AGA AGG AAG TGC AGA-3')。β-肌动蛋白引物 S(5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC-3'),β-肌动蛋白引物 A(5'-AGC CAG GTC CAG ACC CA-3')。

1.2 血管钙化动物模型制备及实验分组

参照 Niederhoffer 等^[7]的方法制备血管钙化动物模型。24 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体重 200~250 g)随机分为 3 组。血管钙化组(维生素 D₃+尼古丁,VDN, n=8):实验第 1 天早上 9 点钟给予维生素 D₃(300 kIU/kg)肌肉注射,尼古丁溶于花生油(25 mg/kg, 5 mL/kg)灌胃,晚 6 点钟尼古丁重复灌胃 1 次;④对照组(n=8):给予等量生理盐水肌注、单纯花生油灌胃分别代替维生素 D₃和尼古丁的处理;④血管钙化+波生坦组(维生素 D₃+尼古丁+波生坦, n=8):钙化模型复制同血管钙化组,波生坦在钙化模型复制后 1 周以 100 mg/(kg·d)灌胃。给药期间定期称体重以调整药量,连续 3 周。各组动物常规饲养 4 周后测尾动脉血压,断头取血,加入含有乙二胺四乙酸(1 g/L)和抑肽酶(516 MIU/L)的试管内,离心分离血浆,-80℃储存备用。摘取心脏、胸和腹主动脉全长,心脏称重,血管用 PBS 冲洗后,分离周围结缔组织备用。

1.3 血管平滑肌细胞培养及钙化^[8,9,10]

无菌取 Sprague-Dawley 大鼠(体重 150~180 g)胸主动脉,剥离血管外结缔组织。贴块法培养 VSMC, VSMC 置于含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基中,置 37℃、5% CO₂ 的孵育箱中培养。实验用第 5~8 代细胞。将 1×10⁷ 个细胞/L 的 VSMC 接种于培养瓶,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基作为对照,细胞钙化处理按文献[10]的方法进行,培养基中含有 10 mmol/L 的 β-磷酸甘油和 10 mmol/L 的丙酮酸钠。每隔两天换液 1 次,第 10 天结束孵育,收集细胞备用。

1.4 血管组织及血管平滑肌细胞的钙含量测定^[10]

将主动脉组织(约 10 mg)及收集的 VSMC 于 80℃彻底烤干,加入 2 mol/L 浓硝酸消化并烤干后,用去离子水(含 27 nmol/L 氯化钾和 27 μmol/L 氯化镉)复融,取 1.5 mL 样品,加入 1% 氯化锶 150 μL。用 703 型原子吸收分光光度计在 422.7 nm 波长下

测定各管的吸光度值,从标准曲线上查出钙含量,并换算成 $\mu\text{mol/g}$ 干重组织。

1.5 血管组织及血管平滑肌细胞的碱性磷酸酶活性测定^[11]

取主动脉组织约 10 mg,加入 PBS 制备匀浆,用 8 kg 离心力离心 10 min,吸取上清液。收集培养的 VSMC,用 200 μL 细胞溶解缓冲液溶解细胞,超声法破碎细胞,离心后取上清。分别用考马斯亮兰法行蛋白定量。按照碱性磷酸酶测定试剂盒说明书,每管加入 1 mL 反应混合液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 1 mol/L NaOH 终止反应,紫外分光光度计测定 405 nm 下的吸光度。用对硝基酚作标准,以 30 min 内产生 1 nmol 的对硝基酚为一个碱性磷酸酶活性单位。

1.6 Von Kossa 染色

按文献[8]方法,将培养的细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放入 10% 福尔马林中固定 45 min,用蒸馏水清洗后,经 5% AgNO_3 处理,在日光下照射 60 min,再用 2.5% 硫代硫酸钠处理 5 min,用碱性品红复染后镜检。

主动脉行石蜡包埋及切片,片厚 7 μm ,常规脱蜡、脱水。浸入 1% 硝酸银溶液,在日光下照射 30 min 后,将玻片放于 5% 硫代硫酸钠溶液中 1 min,碱性品红复染。脱水、透明、封片,光镜观察。

1.7 血管及血管平滑肌细胞⁴⁵CaCl₂ 沉积^[8]

血管⁴⁵CaCl₂ 沉积:取主动脉约 20 mg,制成血管薄片(3~5 mm),置于 1 mL 磷酸盐缓冲液中,加入 37 kBq ⁴⁵CaCl₂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h,冷磷酸盐缓冲液终止反应,加入 0.5 mL 甲酸消化组织,考马斯亮兰法蛋白定量;取 0.2 mL 消化液置于闪烁瓶中,加闪烁液 5 mL,在 β -液体闪烁仪(Beckman LS 6500 型)上测定⁴⁵Ca 的放射强度,换算为血管⁴⁵Ca 沉积量(cpm/mg 蛋白)[cpm:每分钟记数(counts per minute)]。

血管平滑肌细胞⁴⁵CaCl₂ 沉积:细胞钙化孵育结束前,在培养瓶中每孔加入 37 MBq/L 的⁴⁵CaCl₂ 处理 24 h,收集细胞,用冷磷酸盐缓冲液洗涤,加入过氯酸,80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,混合物溶于 1.0 mL 乙烯葡萄糖单甲基酯中,剧烈震荡。按上法测定⁴⁵Ca²⁺ 放射性。

1.8 内皮素放射免疫活性测定^[12]

血管组织 20 mg,剪碎,加 2 mol/L 醋酸煮沸 10 min 后匀浆,17 kg 离心力 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,上清冷冻并贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。VSMC 培养结束后收集培养基,加入 1 mmol/L 醋酸,沸水浴 10 min。

将收集的浆液、血管组织匀浆上清液和 VSMC 培养基过 Sep-Pak C18 柱,经乙氰和三氟乙酸洗脱,

用 100 μL 放射免疫缓冲液复溶。按内皮素放射免疫药盒说明书操作,分别测定血浆、血管组织和细胞培养基中内皮素含量。其 IC₅₀ 为 4~12 pg/管,与大鼠内皮素的交叉反应性为 100%,与大鼠内皮素 2 和内皮素 3 的交叉反应性分别为 3.5% 和 28.0%,与血管紧张素 I^{II} 的交叉反应性为 0。

1.9 血管和血管平滑肌细胞总 RNA 的提取及逆转录聚合酶链反应^[12]

按我室以前的方法取 50~100 mg 血管组织和 10⁶~10⁷ 个 VSMC,用 Trizol 一步法提取血管和 VSMCs 总 RNA。MMLV 逆转录酶及 Oligo(dT)₁₅ primer 逆转录成单链 cDNA。多次 PCR 制备内皮素的竞争性内标准(385 bp)。PCR 反应体系 25 μL : cDNA 1 μL , 5 pmol/L 内皮素 S 及内皮素 A 引物 1 μL , 0.2 fmol/L 竞争性内标准质粒 1 μL , 2.5 mol/L 脱氧核苷三磷酸 1 μL , 含 15 mmol/L MgCl₂ 的 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , Taq DNA 聚合酶 1.25 u; 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min \rightarrow 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 热循环 30 次。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖电泳分离和溴乙锭染色后,用凝胶成像及定量扫描仪测得 446 bp 和 385 bp 两条带的吸光度之比。以系列稀释的正常内皮素 cDNA 质粒代替上述 PCR 体系中的 cDNA,其它 PCR 及定量条件均不变,绘出标准曲线。从标准曲线中求得 mRNA 的含量。取 2 μL PCR 产物,以 β -肌动蛋白引物作 PCR,20 个热循环后,PCR 产物经琼脂糖电泳、凝胶成像及定量扫描仪定量,由 β -肌动蛋白定量的标准曲线中求得标本中 β -肌动蛋白的相对含量,以校正定量 PCR 时的加样误差。重复 3 次独立试验。

1.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One-way ANOVA 作统计学处理,组间比较用 Student Newman Keuls (SNK) 方法检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 β -磷酸甘油诱导培养的血管平滑肌细胞钙化

与对照 VSMC 比较,钙化 VSMC Von Kossa 染色见有大量黑色颗粒沉积,钙化 VSMC 的钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 摄入及碱性磷酸酶活性分别增加 118%、174% 和 7 倍(P 均 < 0.01) (表 1, Table 1; 图 1, Figure 1)。

2.2 大鼠血管钙化指标

钙化组大鼠 Von Kossa 染色见血管中层有大量黑色颗粒沉积,钙化组大鼠主动脉钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 沉积及 ALP 活性分别较对照高 5.0 倍、1.4 倍和 1.4

倍(P 均 < 0.01) (表 2, Table 2; 图 2, Figure 2)。

表 1. 钙化细胞的⁴⁵Ca 摄入、钙浓度和碱性磷酸酶活性

Table 1. ⁴⁵Ca uptake, Ca content and ALP activities in calcified VSMCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	⁴⁵ Ca ²⁺ 摄入 (10 ⁶ cpm/g 蛋白)	钙含量 (μ mol/g 蛋白)	碱性磷酸酶活性 (ku/g 蛋白)
对照组	32.2 \pm 5.2	46.8 \pm 7.2	74 \pm 11
钙化 VSMC 组	88.2 \pm 10.2 ^a	102.2 \pm 18.2 ^a	624 \pm 84 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 钙化血管平滑肌细胞内皮素表达

在对照 VSMC 培养液中内皮素含量为 6.35 \pm 1.11 pmol/L, 钙化 VSMC 培养液内皮素含量为 8.58 \pm 1.92 pmol/L, 较对照组增加 35% ($P < 0.05$)。竞争性定量逆转录聚合酶链反应求得标本中内皮素 cDNA 和竞争性内标准之比, 通过标准曲线求得标本中内皮素 mRNA 含量; 以标本中 β -肌动蛋白 cDNA 相对含量来校正定量 PCR 时标本的加样误差。结果

表 2. 钙化动脉的一般特征和血管、血浆内皮素的含量

Table 2. General characteristics of calcified aorta and endothelin content in the plasma and aorta ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	钙含量 (μ mol/g 干重组织)	碱性磷酸酶 (ku/g 蛋白)	⁴⁵ Ca ²⁺ (cpm/g 蛋白)	内皮素含量	
				血浆 (ng/L)	主动脉 (ng/g 蛋白)
对照组	15.58 \pm 2.02	83.63 \pm 16.85	290 \pm 10	7.08 \pm 1.14	34.48 \pm 4.56
钙化组	93.87 \pm 5.42 ^b	200.10 \pm 10.77 ^b	690 \pm 170 ^b	14.30 \pm 1.17 ^b	70.12 \pm 7.42 ^b
钙化+ 波生坦组	62.62 \pm 7.89 ^{ab}	119.59 \pm 16.59 ^{ab}	440 \pm 740 ^b	11.47 \pm 1.33 ^{ab}	59.43 \pm 7.51 ^{ab}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

发现钙化 VSMC 内皮素 mRNA 含量较对照组高 120% ($P < 0.05$) (表 1, Table 1; 图 3, Figure 3)。

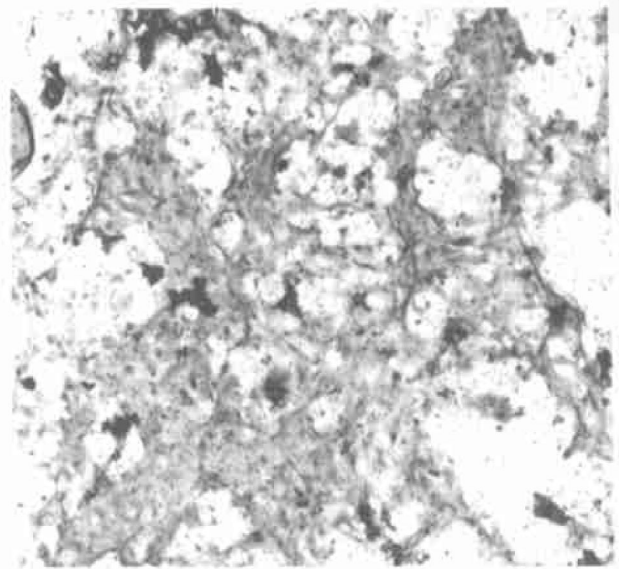


图 1. 血管平滑肌细胞 Von Kossa 染色

Figure 1. Cellular Von Kossa's staining

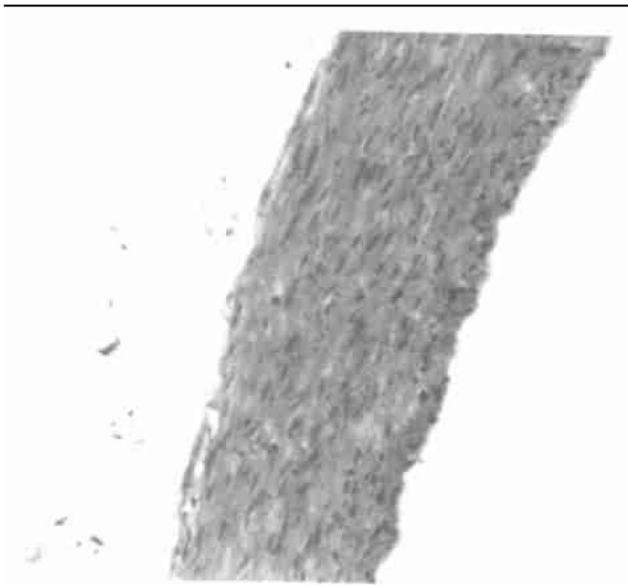


图 2. 钙化血管的 Von Kossa 染色

Figure 2. Calcified vascular Von Kossa's staining

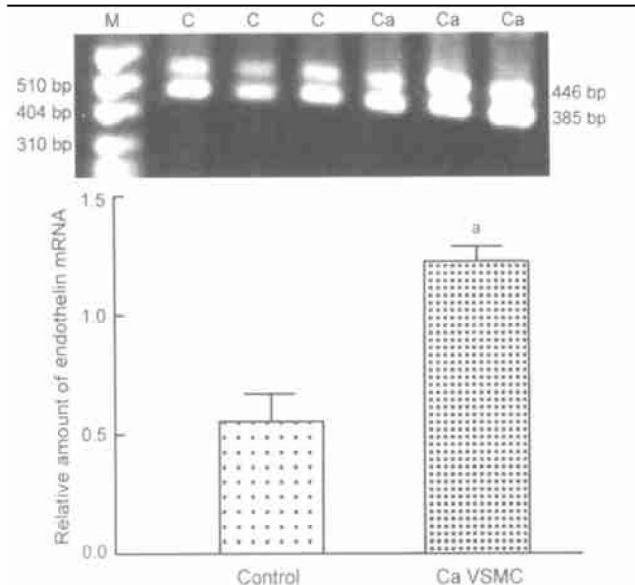


图 3. 钙化血管平滑肌细胞内皮素 mRNA 相对含量

M: 分子量标准; C: 对照组; Ca: 钙化组。a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. The relative amount of endothelin mRNA in calcified VSMC

2.4 钙化大鼠血浆和血管内皮素含量及表达

钙化大鼠血浆和血管组织内皮素含量分别为 14.30 ± 1.17 ng/L 和 70.12 ± 7.42 μ g/g 蛋白, 分别较对照组的 7.08 ± 1.14 ng/L 和 34.48 ± 4.56 μ g/g 蛋白增加 102% 和 103% (P 均 < 0.01)。钙化血管内皮素 mRNA 含量较正常对照组高 22% ($P < 0.01$) (表 2, Table 2; 图 4, Figure 4)。

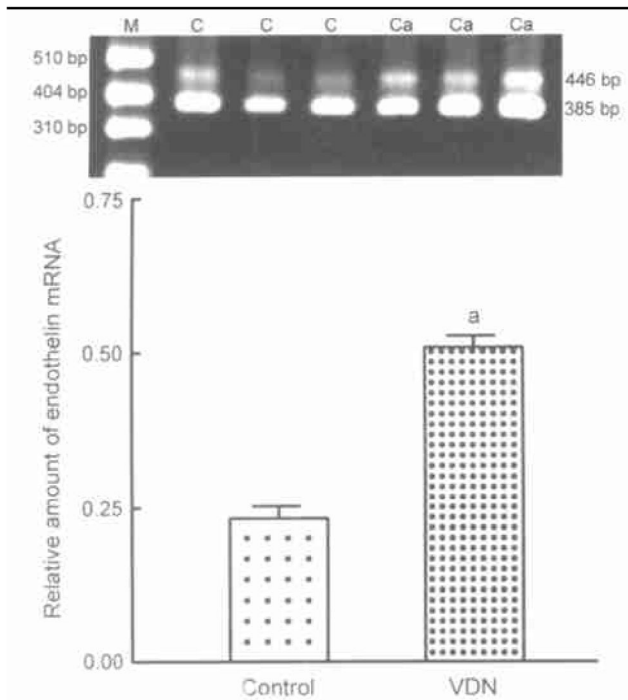


图 4. 钙化血管组织内皮素 mRNA 的相对含量 M: 标准分子量; C: 对照组; Ca: 钙化组。a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 4. The relative amount of endothelin mRNA in calcified vessels

2.5 波生坦组的血管钙化情况

与单纯钙化组比较, 波生坦处理的大鼠血管组织内钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 聚集及碱性磷酸酶活性分别降低了 33%、37%、40% (P 均 < 0.01) (表 2, Table 2)。

3 讨论

血管钙化过程是类似于骨形成和骨质疏松发生的主动的调节过程, 是血管钙化的细胞学基础^[2]。血管细胞尤其是 VSMC 呈现成骨样细胞表型的转变。细胞内出现基质小泡, 大量合成骨基质蛋白和碱性磷酸酶, 钙盐沉积于细胞和细胞外基质^[2]。呈现成骨细胞表型的血管细胞丧失或改变了血管细胞的许多特征, 而血管组织的重要特征是通过合成和分泌大量旁分泌和/或自分泌因子维持循环稳态和血管正常结构, 并参与心血管疾病时心血管组织的

结构重塑调节。血管钙化时其旁/自分泌功能可能发生明显改变。文献报道钙化血管肾上腺髓质素、血管紧张素 ① 及血小板源性生长因子 β 的水平均升高^[13], 而甲状旁腺激素相关肽、C 型利尿肽含量下降^[14, 15], 血管内皮舒张因子一氧化氮和内源性扩血管因子一氧化碳生成均显著减少。内皮素是强烈的缩血管肽和 VSMC 的丝裂原, 血管的内皮细胞、VSMC 和成纤维细胞均能合成和分泌内皮素。高血压、心肌缺血、心衰和动脉粥样硬化等心血管疾病时, 心脏和血管组织的内皮素生成显著增加。高表达的内皮素通过其损伤血管内皮、强烈的收缩血管及刺激血管平滑肌细胞增殖致管腔狭窄等作用, 对这些疾病的发生发展和预后产生重要影响^[13]。

大剂量维生素 D_3 可造成动脉组织钙含量增加, 尼古丁可增强维生素 D_3 的反应, 二者合用可造成动脉组织钙超载, 引起动脉中膜、弹力膜钙沉积, 最终导致血管组织钙化。本实验给大鼠肌注维生素 D_3 和灌胃尼古丁 4 周后, 主动脉钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 沉积及 ALP 活性均较正常对照组大鼠血管显著增加, 血管 Von Kossa 染色呈现典型钙化结节, 与文献报道一致^[10]。 β 磷酸甘油是体内有机磷供体, 提供富含钙磷的微环境, 诱导细胞聚集, 形成多细胞结节, 促进钙磷沉积于细胞内和组织间^[10]。本实验用 β 磷酸甘油诱导离体培养的 VSMC, 细胞钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄入及碱性磷酸酶活性均较正常对照 VSMC 高, Von Kossa 染色见细胞呈现典型钙化结节, 表明磷酸甘油诱导的 VSMC 具有钙化细胞的特征。

血管平滑肌细胞能合成而不能贮存内皮素, 生成的内皮素分泌释放入培养基中, 其分泌量反映培养的 VSMC 内皮素的生成。本实验发现钙化 VSMC 分泌内皮素含量较正常 VSMC 明显增高, 其内皮素 mRNA 的表达也明显上调。本实验给予维生素 D_3 和尼古丁诱导的血管钙化大鼠, 血浆和血管内皮素含量均明显高于正常对照组; 钙化的血管组织内皮素 mRNA 的水平也明显上调, 提示内皮素基因表达的上调可能是钙化血管和 VSMC 中内皮素增加的主要原因。编码内皮素的基因定位在 $6\text{P}_{23} \sim \text{P}_{24}$ 染色体上, 人内皮素基因含有 5 个外显子和 4 个内含子。在内皮素基因 5' 端上游还存在调节内皮素基因转录和表达的正负调控元件。凝血酶、肾上腺素、血管紧张素 ① 、精氨酸加压素等与其受体结合后经过激活蛋白激酶 C 介导, 而促进内皮素基因的转录。血管组织和 VSMC 钙化时内皮素基因表达上调的细胞信号转导机制目前尚不清楚, 有待进一步研究。波

生坦是内皮素受体的非特异性阻断剂,本实验中应用波生坦可明显减轻血管钙化程度,血管组织钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 聚集及碱性磷酸酶活性均明显低于单纯钙化组,提示内皮素在血管钙化的发病中具有一定的作用。

内皮素促进血管钙化的发病机制目前尚不清楚。文献报道内皮素在骨形成和骨吸收过程中具有重要作用。在成骨样 MC3T3-E1 细胞,内皮素以时间和剂量依赖的方式刺激钠依赖的磷转运,而磷的转运是启动骨基质钙化的重要原因^[16]。在骨肉瘤细胞株 MC3T3-E1 中内皮素可上调骨桥蛋白、破骨细胞和 iv 型胶原的基因表达,并诱导骨吸收和促进骨组织的胶原和非胶原蛋白的合成,抑制破骨细胞的骨吸收。源于羊膜的人肿瘤 WISH 细胞株,其内皮素基因表达和蛋白合成均增多,增加的内皮素在体内可诱导新生骨形成。在成骨样 MC3T3-E1 和 UMR-106 细胞,内皮素通过钙离子通道促进细胞外钙向细胞内流动,但钙内流如何引起 VSMC 内钙超载使钙沉积于 VSMC 并最终导致血管和细胞的钙化?目前尚不清楚。文献^[17]还报道,成骨细胞可合成和分泌内皮素并富含内皮素的受体(内皮素 A 受体和内皮素 B 受体),内皮素与其受体结合可激活成骨细胞的蛋白激酶 C 途径导致钙化,并通过激活磷脂酶 A、C 和 D 的活性而刺激磷脂的逆转。内皮素是否亦通过上述途径导致血管和细胞的钙化?目前亦不清楚。内皮素是强的丝裂原,可促进 VSMC 的增殖和增生肥大,并可加重 VSMC 由收缩型向合成型转变,文献报道内皮素亦可促进成骨细胞 DNA 的合成,为成骨细胞强的丝裂原;而内皮素是否促进 VSMC 向成骨细胞样的表型转换亦不清楚。

本实验通过整体动物和离体细胞发现,钙化的血管和 VSMC 具有内皮素高表达,应用内皮素受体阻断剂波生坦可减轻血管钙化程度。表明内皮素可能作为血管钙化发病的一种内源性致病因素,参与钙化的发生、发展。针对内皮素作为血管钙化发病的防治靶点,可能具有临床意义,有待于进一步研

究。

[参考文献]

- [1] Mody N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. Vascular calcification and its relation to bone calcification: Possible underlying mechanisms. *J Nucl Cardiol*, 2003, **10** (2): 177-183
- [2] Bostrom K. Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol*, 2001, **88** (2A): 20E-22E
- [3] Wallin R. Arterial calcification: A review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev*, 2001, **21** (4): 274-301
- [4] Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*, 2000, **283** (10): 2 810-815
- [5] Proudfoot D, Skeppe JN, Catherine M. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (3): 379-388
- [6] 汤健,唐朝枢,杨军. 内皮素. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1994; 42-59
- [7] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giannelis P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D₃ plus nicotine. *J Vasc Res*, 1997, **34** (5): 386-398
- [8] Qi YF, Wang SH, Zhang BH, Bu DF, Shu TC, Du JB. Changes in amount of ADM mRNA and RAMP2 mRNA in calcified vascular smooth muscle cells. *Peptides*, 2003, **24** (2): 287-294
- [9] 石彦荣,牛大地,王述,高霖,齐永芬,庞永正,等. 同型半胱氨酸抑制培养的大鼠血管平滑肌细胞牛磺酸转运. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 203-205
- [10] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S. β -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15** (11): 2 003-009
- [11] 齐永芬,牛大地,王述,卜定方,石彦荣,高霖,等. 钙化心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 375-378
- [12] 齐永芬,卜定方,唐朝枢. 尾加压素^②促进大鼠血管平滑肌细胞内皮素生成. *科学通报*, 2002, **47** (4): 289-292
- [13] Zhang B, Tang C, Jiang Z. Effects of adrenomedullin on vascular calcification in rats. *Z Kardiol*, 2000, **91** (7): 568-574
- [14] Lanske B, Amling M, Neff L, Guiducci J, Baron R, Kronenberg HM. Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J Clin Invest*, 1999, **104** (4): 399-407
- [15] Suda M, Komatsu Y, Tanaka K, Yasoda A, Sakuma Y, Tamura N, et al. C-Type natriuretic peptide/guanylate cyclase B system in rat osteogenic ROB-C26 cells and its downregulation by dexamethazone. *Calcif Tissue Int*, 1999, **65** (6): 472-478
- [16] Masukawa H, Miura Y, Sato I, Oiso Y, Suzuki A. Stimulatory effect of endothelin 1 on Na⁺-dependent phosphate transport and its signaling mechanism in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem*, 2001, **83** (1): 47-55
- [17] Said SA, El-Mowafy AM. Role of endogenous endothelin-1 in stress-induced gastric mucosal damage and acid secretion in rats. *Regulatory Peptides*, 1998, **73** (1): 43-50

(此文编辑 曾学清)

•信息•

重 要 通 知

凡欲参加 2003 年 9 月 28 日~ 10 月 2 日在 Kyoto 召开的第 13 次国际动脉粥样硬化学术研讨会的专家请与中国动脉硬化杂志编辑部联系。