

# 脂联素通过减轻内质网应激介导的凋亡抑制心肌细胞钙化

赵旭静<sup>1</sup>, 边云飞<sup>1</sup>, 白瑞<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 肖传实<sup>2</sup>

(山西医科大学 1. 第二临床医学院心内科, 2. 第一临床医学院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 脂联素; 钙化; 内质网应激; 心肌细胞; 凋亡

[摘要] **目的** 通过培养 SD 大鼠乳鼠心室肌细胞并建立细胞钙化模型, 观察脂联素对心肌细胞钙化的影响及其机制。**方法** 采用 II 型胶原酶消化法原代培养 SD 大鼠乳鼠心室肌细胞,  $\alpha$  肌动蛋白免疫荧光法进行鉴定。选用培养 72 h 的单层心肌细胞, 实验分为 3 组: 对照组、钙化组、脂联素 + 钙化组。 $\beta$ -甘油磷酸钠和丙酮酸钠联合诱导制备心肌细胞钙化模型, 茜素红和 Von Kossa 染色法对钙化心肌细胞进行鉴定, 通过细胞钙含量、碱性磷酸酶活性和骨钙素的测定判断钙化程度。通过乳酸脱氢酶活性测定和流式细胞术检测心肌细胞凋亡。用定量实时聚合酶链反应测定骨保护素及内质网应激指标葡萄糖调节蛋白 78、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 的表达。**结果** 与对照组相比, 单纯心肌细胞钙化后, 钙含量、碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌量显著增加 ( $P < 0.01$ ), 骨保护素及内质网应激指标葡萄糖调节蛋白 78 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 在 mRNA 水平表达明显增高, 乳酸脱氢酶活性和细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ )。用脂联素进行干预后, 可较大幅度地逆转上述指标变化, 与心肌细胞钙化组相比均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 并且呈现一定的浓度依赖性。**结论** 钙化心肌细胞可以诱导心肌细胞内质网应激介导的凋亡; 脂联素可促进血管保护因子骨保护素的表达, 并通过减轻内质网应激来减轻心肌细胞钙化及凋亡, 对心肌细胞有保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Adiponectin Inhibited Calcification in Cultured Rat Neonatal Cardiomyocytes via Reducing Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis

ZHAO Xu-Jing<sup>1</sup>, BIAN Yun-Fei<sup>1</sup>, BAI Rui<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, and XIAO Chuan-Shi<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China;

2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Adiponectin; Calcification; Cardiomyocytes; Endoplasmic Reticulum Stress; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of adiponectin on calcification in cultured cardiomyocytes via reducing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in vitro. **Methods** Primary cultured cardiomyocytes were obtained from neonatal rats by collagenase II digestion method. The  $\alpha$ -actin expression as molecular marker of the cardiomyocytes was observed by immunocytochemistry. The cells cultured for 72 h were used in the experiment and divided into groups randomly: control group, calcified myocardial cells (CMC) group, adiponectin + CMC (3, 10, 20, 30 mg/L) groups.

The morphological changes of the cardiomyocytes were observed under phase contracted microscope. CMC was prepared by incubation with  $\beta$ -glycerophosphate (BGP). Calcification was confirmed by Von Kossa staining and Alizarin Red S. Calcium content and alkaline phosphatases (ALP). Alkaline phosphatase was measured by spectrophotometric measurement of p-nitrophenol release. Osteocalcin was detected by radioimmunoassay. The content of lactate dehydrogenase (LDH) was measured. The cardiomyocyte apoptosis was detected by flow cytometry. The expression levels of glucose regulated protein 78 (GRP78)/cysteine-containing aspartate-specific proteases-12 (Caspase-12)/osteoprotegerin (OPG) mRNA were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

**Results** The immunocytochemical stain for smooth muscle  $\alpha$ -actin confirmed cardiomyocytes phenotype and the multicellular nodules spontaneously

spontaneously. The immunocytochemical stain for smooth muscle  $\alpha$ -actin confirmed cardiomyocytes phenotype and the multicellular nodules spontaneously. The immunocytochemical stain for smooth muscle  $\alpha$ -actin confirmed cardiomyocytes phenotype and the multicellular nodules spontaneously.

[收稿日期] 2011-12-30

[作者简介] 赵旭静, 硕士研究生, 研究方向为冠状动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 telxjzhao@sina.com。边云飞, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

appeared in cardiomyocytes culture. ALP activity and the content of calcium and osteocalcin in calcified myocardial cells was increased by 138% and 136.9% (all  $P < 0.05$ ), respectively, compared with control. The apoptotic rate and the levels of LDH was also significantly increased. Compared to untreated cells, the mRNA levels of GRP78 and Caspase-12 increased in CMC, but the mRNA levels of OPG decreased. Adiponectin elevated the level of OPG mRNA, but suppressed ALP activity, the content of calcium, osteocalcin secretion and decreased mRNA levels of GRP78 and Caspase-12 in a dose-dependent manner. **Conclusion** Adiponectin inhibits calcification in cultured rat neonatal cardiomyocytes via reducing endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and plays a protective role by extenuation of cardiomyocytes calcification.

心血管组织的钙化是高血压、动脉粥样硬化、糖尿病血管病变和肾性心血管病的重要危险因素<sup>[1]</sup>。研究发现心血管组织钙化是钙磷沉积于心肌和血管平滑肌细胞,使心血管细胞向成骨样细胞表型转化的主动过程,受到体内许多因素的调控<sup>[2]</sup>。脂联素具有抗动脉粥样硬化、抗炎、增加机体对胰岛素敏感性、抗糖尿病等作用,是心血管疾病的保护因子<sup>[3]</sup>。Duan 等<sup>[4]</sup>研究证实内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的凋亡参与血管钙化,但脂联素是否通过减轻 ERS 来减轻心肌细胞钙化尚未见文献报道。本研究采用离体纯化培养的乳鼠心室肌细胞建立心肌细胞钙化模型,在细胞水平观察脂联素对心肌细胞钙化损伤的影响,同时在基因水平观察 ERS 指标葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 (cysteine-containing aspartate-specific proteases-12, Caspase-12) 的表达变化,探讨脂联素是否通过减轻 ERS 来抑制心肌细胞钙化,为心血管组织钙化的防治提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SD 新生大鼠(1~3 天),雌雄不限,由山西医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 重组人脂联素(R&D 公司)、DEME 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、兔抗人  $\alpha$  肌动蛋白一抗(Acris 公司)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗兔二抗(Solarbio 公司)、 $\beta$ -甘油磷酸钠( $\beta$ -glycerophosphate, BGP)(Sigma 公司,美国)、茜素红 S 染料(上海江莱生物科技有限公司)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)、骨钙素测定试剂盒(上海研吉生物科技有限公司)、Annexin V-FITC 流式检测试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司),其余试剂均为国产分析纯产品。

### 1.2 鼠心室肌细胞的原代培养及纯化

选取出生 1~3 天的 SD 乳鼠,采用 Webster 等报道的方法并加以适当的改进,无菌条件下开胸取心脏剪碎,采用 II 型胶原酶消化、差速贴壁培养,调整细胞浓度到  $1 \times 10^6$  个/ $\text{cm}^3$ ,接种于培养板。取原代培养 72 h 的心肌细胞进行实验。

### 1.3 原代心肌细胞的鉴定

倒置显微镜下观察细胞形态及自发搏动情况。针对胞浆中心  $\alpha$  肌动蛋白,采用  $\alpha$  肌动蛋白一抗与 FITC 羊抗兔 IgG(荧光二抗)免疫荧光法鉴定心肌细胞。

### 1.4 实验分组

实验分 3 组:(1)对照组:心肌细胞正常培养;(2)钙化组:采用 Shioi 等描述的方法在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中加入 10 mmol/L BGP、10 mmol/L 丙酮酸钠连续培养 10 天,每 2~3 天换液 1 次;(3)脂联素+钙化组:脂联素分别用不同的浓度(3、10、20、30 mg/L)与心肌细胞孵育 48 h,余同钙化组。

### 1.5 钙化心肌细胞染色

根据文献方法对钙化心肌细胞(calcified myocardial cells, CMC)染色。(1)茜素红 S 染色:冰丙酮固定细胞爬片 20 min,浸入 1% 茜素红溶液内 30 min,0.2% 醋酸溶液快速冲洗 1 次,滤纸吸干。系列乙醇脱水,二甲苯固定、封片。钙盐沉积处被染为橘红色。(2)Von Kossa 染色:冰丙酮固定细胞爬片 20 min,浸入 5% 硝酸银溶液,避光室温孵育 15 min,紫外线灯下照射 10 min,蒸馏水冲洗后浸入 5% 硫代硫酸钠溶液内 1 min,蒸馏水充分洗涤,最后用 1% 碱性品红复染 1 min。钙盐沉积处被染为黑色。

### 1.6 生化指标测定

1.6.1 碱性磷酸酶测定 取上述方法培养的心肌细胞,加入适量 1% Triton X-100 生理盐水,4℃ 放置 24 h,超声波处理 20 s 后反复吹打,使细胞充分破裂,离心后取上清采用 ALP 检测试剂盒测量 ALP 活性。同时取少量样品采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测量蛋白含量,校正 ALP 活性。

1.6.2 钙含量测定 按照上述步骤收集上清,采

用钙测定试剂盒测量细胞钙含量。同时取少量样品采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测量蛋白含量,校正钙含量。

**1.6.3 骨钙素测定** 取上述心肌细胞培养上清液,用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测上清液中骨钙素含量,Bradford 方法测定细胞内总蛋白量,校正骨钙素含量。

**1.6.4 乳酸脱氢酶的测定** 用试剂盒检测细胞培养液 LDH 的活性,LDH 的活性用 u/L 表示。

### 1.7 心肌细胞凋亡率的测定

用 0.125% 胰蛋白酶制备单细胞悬液,用膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染色标记法进行流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。

### 1.8 定量实时聚合酶链反应测定 mRNA 表达量

定量实时聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)测定方法如下:

采用 RNAiso plus 提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 量,吸光度( $A_{260/280}$ )均在 1.7 ~ 2.0。将 RNA 反转录成 cDNA,进行两步法扩增,PCR 反应体系为 20  $\mu$ L; cDNA 1  $\mu$ L, RNA 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 2  $\times$  Mix 8  $\mu$ L, 实验引物依据文献检索及 Primer 5.0 软件进行设计并验证,由上海生工生物有限公司进行合成。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。使用 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 分析仪进行扩增及定量分析。反应结束后,确认实时 PCR 的扩增曲线和溶解曲线,各组 PCR 均重复 3 次。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $Ct$  表示反应体系中荧光信号的强度值,  $\Delta Ct =$  目的基因  $Ct -$  参照基因  $Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct =$  待测样本  $\Delta Ct -$  校准样本  $\Delta Ct$ ,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数)方法进行 mRNA 相对定量分析(表 1)。

表 1. GRP78、Caspase-12、OPG、GAPDH 引物序列

Table 1. Primer sequence of GRP78, Caspase-12, OPG and GAPDH

名称	上游引物	下游引物	bp
GRP78	55'-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3'	5'-GCATCCTGGTGGCTTTCAGCCATTC-3'	345
Caspase-12	5'-GAAGGAATCTGTGGGGTAA-3'	5'-TCCCTTTGCTTGTGGATACC-3'	181
OPG	5'-GAATGGTCACTGGGCTGTTT-3'	5'-GAGGAAGGAAAGGGCCTATG-3'	272
GAPDH	5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	307

GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)。

### 1.9 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法。

## 2 结果

### 2.1 原代培养心肌细胞的形态特征及鉴定

倒置显微镜下可见心肌细胞形态多样,呈梭形、三角形或星形,核呈卵圆形并居中,折光性强(图 1A)。细胞伸出伪足,成簇生长,并可见明显的同步节律性搏动。荧光倒置显微镜下,心肌  $\alpha$  肌动蛋白免疫荧光可见胞浆呈现黄绿色荧光(图 1B),符合心肌细胞的特征。

### 2.2 钙化心肌细胞的形态特征

倒置显微镜观察:随着培养时间延长,单纯钙化组细胞内颗粒增多,透明度下降,少数细胞胞质内出现空泡,少量细胞脱落死亡,细胞层出现弥漫分布的点、片状黑色沉淀物。茜素红染色时,与对照组(图 2A1)相比,钙化组(图 2A2)可见许多橘红色深染区

散在分布于细胞间,部分呈结节状,从而证实细胞层出现明显的钙盐沉积。Von Kossa 染色时,与对照组(图 2B1)相比,钙化组(图 2B2)可见细胞间散在分布着许多黑色沉着区。

### 2.3 碱性磷酸酶活性、钙含量、骨钙素和乳酸脱氢酶活性

钙化组 ALP 活性和钙含量较对照组明显升高( $P < 0.01$ ),不同浓度脂联素组 ALP 活性和钙含量明显低于钙化组( $P < 0.05$ ),且脂联素的作用呈现剂量依赖关系(表 2)。

### 2.4 心肌细胞凋亡率

对照组细胞生长良好,钙化组出现大量凋亡细胞,并有部分坏死细胞,与对照组相比差别显著( $P < 0.01$ )。不同浓度的脂联素预处理后在流式图中 B4 区和 B2 区的细胞分布均明显减少,即减少了细胞钙化造成的凋亡和坏死,凋亡率均较钙化组明显减低( $P < 0.05$ ),且脂联素的作用呈现剂量依赖关系(表 3 和图 3)。

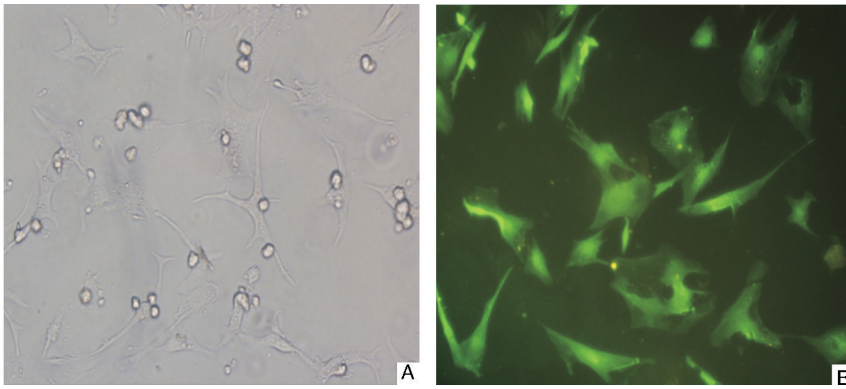


图 1. 原代培养乳鼠心肌细胞及鉴定 ( $\times 200$ ) A 为原代培养乳鼠心肌细胞, B 为  $\alpha$  肌动蛋白免疫荧光染色对心肌细胞的鉴定。

Figure 1. Primary culture and identification of neonatal rat cardiomyocytes

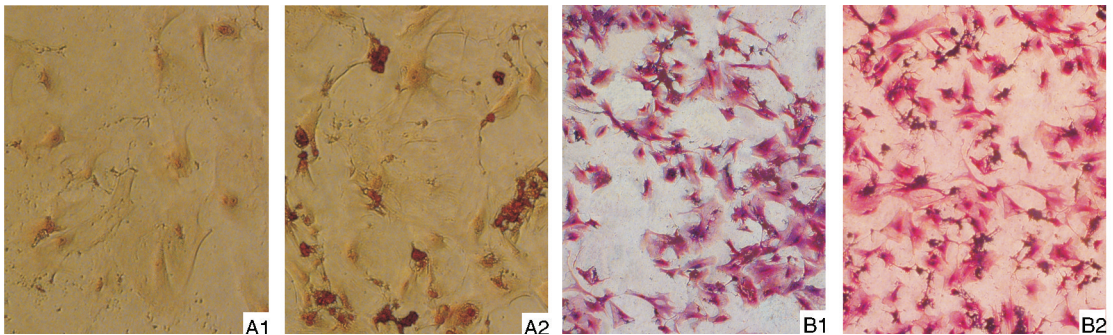


图 2. 钙化心肌细胞的形态特征 ( $\times 200$ ) A1 为对照组茜素红染色, A2 为钙化组茜素红染色; B1 为对照组 Von Kossa 染色, B2 为钙化组 Von Kossa 染色。

Figure 2. Calcification morphological characteristics of cardiomyocytes

表 2. 各组心肌细胞 ALP、钙含量、骨钙素和 LDH 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2. Comparison of the ALP, calcium, osteocalcin, and LDH level in different groups

分 组	ALP(ku/g)	钙含量(mmol/g)	骨钙素( $\mu$ g/L)	LDH(u/L)
对照组	48.92 $\pm$ 4.46	41.01 $\pm$ 14.10	8.63 $\pm$ 3.32	20.28 $\pm$ 1.67
钙化组	320.68 $\pm$ 13.66 <sup>a</sup>	340.73 $\pm$ 17.20 <sup>a</sup>	96.48 $\pm$ 4.58 <sup>a</sup>	64.14 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>
3 mg/L 脂联素 + 钙化组	278.00 $\pm$ 11.53 <sup>ab</sup>	307.43 $\pm$ 23.82 <sup>ab</sup>	307.43 $\pm$ 23.82 <sup>ab</sup>	78.41 $\pm$ 1.06 <sup>ab</sup>
10 mg/L 脂联素 + 钙化组	237.08 $\pm$ 8.61 <sup>ab</sup>	276.52 $\pm$ 7.28 <sup>ab</sup>	64.38 $\pm$ 2.93 <sup>ab</sup>	126.08 $\pm$ 7.29 <sup>ab</sup>
20 mg/L 脂联素 + 钙化组	204.95 $\pm$ 4.73 <sup>ab</sup>	246.97 $\pm$ 4.22 <sup>ab</sup>	44.11 $\pm$ 4.24 <sup>ab</sup>	177.18 $\pm$ 9.54 <sup>ab</sup>
30 mg/L 脂联素 + 钙化组	152.12 $\pm$ 10.85 <sup>ab</sup>	205.06 $\pm$ 3.28 <sup>ab</sup>	21.34 $\pm$ 1.51 <sup>ab</sup>	234.47 $\pm$ 14.20 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

表 3. 各组心肌细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3. Apoptotic rates of cardiomyocytes in different groups

分 组	n	凋亡率
对照组	4	2.65% $\pm$ 1.16%
钙化组	4	26.43% $\pm$ 1.74% <sup>a</sup>
3 mg/L 脂联素 + 钙化组	4	21.12% $\pm$ 1.28% <sup>ab</sup>
10 mg/L 脂联素 + 钙化组	4	15.57% $\pm$ 1.10% <sup>ab</sup>
20 mg/L 脂联素 + 钙化组	4	11.46% $\pm$ 0.94% <sup>ab</sup>
30 mg/L 脂联素 + 钙化组	4	8.43% $\pm$ 1.20% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

## 2.5 葡萄糖调节蛋白 78、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12、骨保护素 mRNA 的表达

钙化组 GRP78 mRNA、Caspase-12 mRNA 表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), 骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ; 图 4); 不同浓度脂联素组 GRP78 mRNA、Caspase-12 mRNA 表达明显低于钙化组 ( $P < 0.05$ ), OPG mRNA 表达明显高于钙化组 ( $P < 0.05$ ), 且随着脂联素浓度的增大, GRP78 mRNA、Caspase-12 mRNA 表达量减低, OPG mRNA 表达

量增加,脂联素的作用呈现剂量依赖关系。

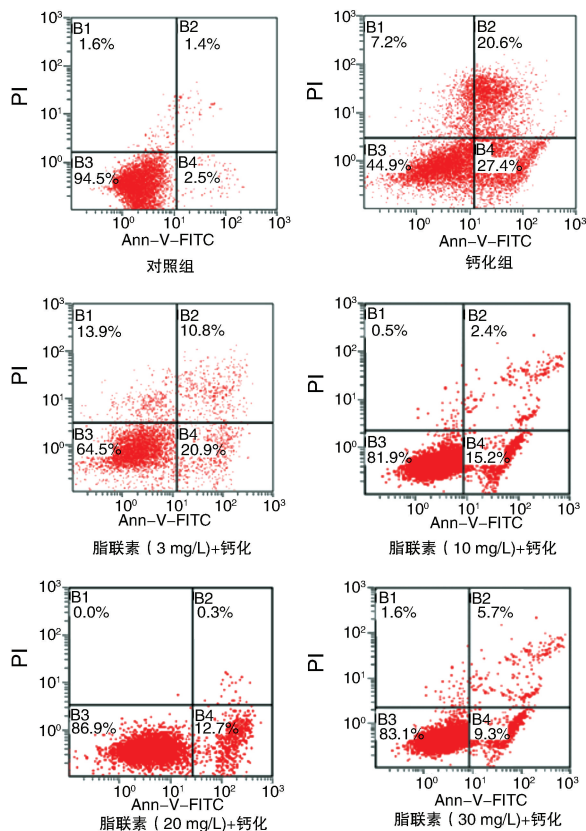


图 3. 各组心肌细胞凋亡

Figure 3. Apoptotic of cardiomyocytes in different groups

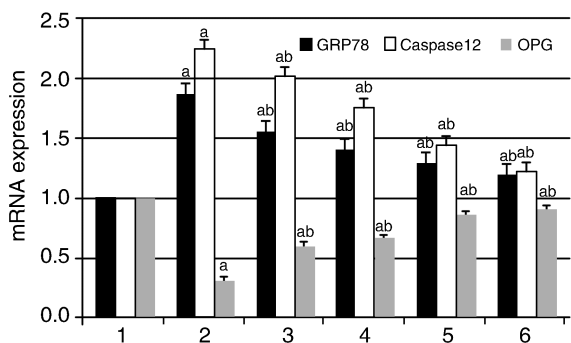


图 4. 各组心肌细胞 GRP78、Caspase-12、OPG mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ ) 1 为对照组,2 为钙化组,3 为 3 mg/L 脂联素 + 钙化组,4 为 10 mg/L 脂联素 + 钙化组,5 为 20 mg/L 脂联素 + 钙化组,6 为 30 mg/L 脂联素 + 钙化组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

Figure 4. Quantitative Real-time PCR showed GRP78, Caspase-12 and OPG mRNA expression in different groups

### 3 讨论

异位钙化是指非骨组织钙化,伴有或者不伴有

组织坏死和损伤。心血管组织钙化是比较常见的一种异位钙化,与动脉粥样硬化、心肌梗死、脑卒中、猝死等临床疾病息息相关,是导致心、脑血管事件的重要危险因素。研究发现心血管组织钙化是类似于骨基质矿化的主动、可调控过程<sup>[5]</sup>。随心血管组织钙化进展,钙化心肌细胞失去了心肌细胞原有表型特征,而具备成骨细胞的特征和功能,合成并分泌多种骨特异性蛋白,出现成骨细胞的特征性基因表达。

碱性磷酸酶是基质小泡的重要组成,广泛存在于全身的血管中,是钙盐形成过程中重要的酶。研究发现,生物钙化过程中 ALP 可水解各种磷酸酯键,增加局部羟磷灰石晶体中磷酸盐浓度,为磷酸钙结晶的生成提供原料;此外 ALP 还可水解焦磷酸盐,解除其对磷酸钙生成的抑制作用<sup>[6]</sup>。骨钙素为体内最丰富的非胶原类骨基质蛋白,是骨细胞成熟的晚期标志之一。骨钙素可促进骨吸收并抑制矿化,调节骨矿含量,特别是羟基磷灰石结晶的排列。ALP 和骨钙素是成骨细胞的表型特征,在心血管组织钙化中起重要作用<sup>[7]</sup>。

脂联素是脂肪细胞特异性分泌的生物活性多肽,具有抗糖尿病、抗炎、抗动脉粥样硬化斑块形成、保护血管的生理效应<sup>[8]</sup>。研究发现血清脂联素水平与冠状动脉钙化程度呈负相关,血清脂联素水平降低预示冠状动脉钙化恶化,而脂联素水平升高可减缓心血管病变进一步发生<sup>[9,10]</sup>。Berner 等<sup>[11]</sup>研究发现成骨细胞有脂联素及其受体的表达,提示脂联素可能参与了动脉钙化的调节过程。OPG 即破骨细胞生成抑制因子,是肿瘤坏死因子受体家族的一员,可在体内外调节破骨细胞的形成、分化、存活并诱导其凋亡。OPG 基因敲除小鼠出生后出现早期的全身性骨质疏松和主动脉中层钙化<sup>[12]</sup>。研究发现 OPG 能抑制动脉粥样硬化病变扩大和动脉钙化<sup>[13]</sup>。因此 OPG 既是骨代谢的重要调节因子,又是重要的血管保护因子,与血管钙化关系密切<sup>[14]</sup>。

内质网应激与心血管疾病,如动脉粥样硬化、心肌缺血和心肌病等的发生和发展密不可分。研究表明内质网应激是一种自我保护性机制,通过上调分子伴侣 GRP78 来发挥保护作用,GRP78 被认为是内质网稳态的中心调节剂<sup>[15]</sup>,也被认为是内质网应激的标志。过度 ERS 可以诱导细胞凋亡从而加重细胞损伤,Caspase-12 激活是触发内质网应激相关凋亡途径的重要信号转导通路,在 ERS 时被特异性激活而诱导细胞凋亡。近年内质网应激凋亡信号途径在心血管组织钙化诱发细胞凋亡机制中的作用已引起广泛重视。

$\beta$ -甘油磷酸钠是体内有机磷供体,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<sup>[10]</sup>。因此本实验采用BGP诱导离体培养的新生乳鼠心肌细胞形成钙化心肌细胞,使正常的心肌细胞转化为成骨细胞样表型,观察脂联素对钙化心肌细胞损伤的影响。结果发现离体培养的乳鼠心肌细胞可以形成明显细胞矿化结节,钙含量、ALP活性和骨钙素含量较对照组明显增加,标志着局部细胞发生成骨细胞样分化,表明细胞已具备矿化的能力。心肌细胞钙化后细胞凋亡率显著增加,内质网应激指标GRP78和Caspase-12 mRNA水平明显增加,血管保护因子OPG mRNA水平明显降低;而脂联素预处理后再进行心肌细胞钙化,上述改变均能得到较大程度地逆转,并且呈现一定的浓度依赖性。这些结果证实脂联素可促进血管保护因子OPG的表达,减轻心肌细胞钙化,抑制心肌细胞表型向成骨细胞样表型转化,其可能作用靶点在质网,通过减轻内质网应激,改善内质网功能的稳态进一步减少心肌细胞凋亡来发挥心血管保护作用,为动脉粥样硬化、心肌梗死等疾病的细胞保护治疗提供了新的方向。

#### [参考文献]

[1] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J, et al. Vascular calcification pathobiological mechanisms and clinical implications[J]. *Circ Res*, 2006, 9 (10): 1 044-059.

[2] Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15 (12): 2 959-964.

[3] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors[J]. *Endocrine Reviews*, 2005, 26 (3): 439-451.

[4] Duan X, Zhou Y, Teng X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387 (4): 694-699.

[5] 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]. *J Cell Biochem*, 2006, 99 (5): 1 343-

352.

[6] Oshi K, Ejiri S, Ozawa H, et al. Localizational alterations of calcium, phosphorus and calcificating-related organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16 (2): 289-298.

[7] Son BK, Kozaki K, Iijima K, et al. Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 556 (1-3): 1-8.

[8] Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL, et al. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009, 6 (1): 27-35.

[9] Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D, et al. Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease[J]. *Heart*, 2004, 90 (5): 528-533.

[10] Kircelli F, Peter ME, Sevincok E, et al. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27 (2): 514-521.

[11] Bener HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, et al. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells[J]. *Bone*, 2004, 35 (4): 842-849.

[12] Xie H, Xie PL, Chen SM, et al. Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92 (2): 296-306.

[13] Di Bartolo BA, Schoppet M, Mattar MZ, et al. Calcium and osteoprotegerin regulate IGF1R expression to inhibit vascular calcification[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91 (3): 537-545.

[14] Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, et al. Development of arterial calcification in adiponectin-deficient mice; adiponectin regulates arterial calcification[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24 (8): 1 461-468.

[15] Xin W, Li X, Niu K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in a heart failure model induced by chronic myocardial ischemia[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27 (4): 503-509.

(此文编辑 曾学清)