

# 维生素 K2 对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化内膜钙化和 Toll 样受体 2 及 4 表达的影响

朱杰, 王中群, 王昭军, 戴芝银, 杨洪强

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 维生素 K2; Toll 样受体; ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠; 内膜钙化

[摘要] 目的 探讨维生素 K2 对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化内膜钙化和 Toll 样受体 2(TLR2) 及 TLR4 表达的影响。方法 18 只 6 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 随机分为模型组、维生素 K2 干预组及对照组, 每组 6 只。模型组及维生素 K2 干预组小鼠予高脂饮食, 对照组小鼠予普通饮食喂养。维生素 K2 干预组在高脂饮食基础上同时予维生素 K2 灌胃, 每天 1 次, 共 12 周。小鼠 19 周龄时处死, 测定血清脂质水平; HE 染色观察主动脉组织形态学变化, Von Kossa 染色观察主动脉钙化; 测定血管钙含量和碱性磷酸酶活性判断血管钙化程度; 免疫组织化学法、实时定量 PCR(qRT-PCR) 分别检测主动脉 TLR2、TLR4 蛋白和 mRNA 的表达。结果 模型组小鼠主动脉 HE 染色可见内膜显著增厚, 有典型的动脉粥样硬化斑块形成, Von Kossa 染色斑块纤维帽下可见灶状黑色钙化团块, 维生素 K2 干预组小鼠主动脉可见粥样硬化斑块, 但 Von Kossa 染色斑块内未见明显黑色钙盐沉积; 定量分析显示, 维生素 K2 干预组小鼠主动脉血管壁钙含量和碱性磷酸酶活性均明显低于模型组( $P < 0.01$ ); 免疫组织化学染色显示 TLR2、TLR4 主要表达于粥样硬化斑块内, qRT-PCR 证实模型组小鼠主动脉 TLR2、TLR4 表达均显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 维生素 K2 干预组小鼠主动脉 TLR2、TLR4 mRNA 及蛋白水平较模型组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。小鼠主动脉钙含量与 TLR2 mRNA 表达呈正相关( $r = 0.77, P < 0.001$ ), 与 TLR4 mRNA 表达亦呈正相关( $r = 0.79, P < 0.001$ )。结论 维生素 K2 可降低高脂饮食 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉中钙含量和碱性磷酸酶活性, 减少主动脉血管壁 TLR2、TLR4 的表达, 维生素 K2 抑制内膜钙化的作用可能与下调 TLR2、TLR4 的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Vitamin K2 on Calcification and Expression of Toll-like Receptor 2 as well as Toll-like Receptor 4 in Aortic Artery of ApoE<sup>-/-</sup> Mice

ZHU Jie, WANG Zhong-Qun, WANG Zhao-Jun, DAI Zhi-Yin, and YANG Hong-Qiang

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Vitamin K2; Toll-like Receptor; ApoE<sup>-/-</sup> Mice; Intimal Calcification

[ABSTRACT] **Aim** To assess the effects of vitamin K on calcification and the expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) as well as Toll-like receptor 4 (TLR4) in aortic artery of ApoE<sup>-/-</sup> mice. **Methods** Eighteen 6-week-old male ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into model group, interventional group and control group. Model group and interventional group were fed with high-fat diet, while control group were fed with normal diet. Mice in interventional group were administered orally with vitamin K2, once a day for 12 weeks. All mice were sacrificed when the mice were 19 weeks old, blood was collected and plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL), low density lipoprotein cholesterol (LDL) were measured. Aortic sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or Von Kossa, and observed under microscope. Calcium content and alkaline phosphatase activity of aorta were measured to determine the degree of vascular calcification. The expressions of TLR2 and TLR4 protein and mRNA

[收稿日期] 2014-07-14

[修回日期] 2014-09-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81370408);江苏省自然科学基金(BK20131246);江苏省卫生厅项目(Q201308);镇江市社会发展项目(SH2013024)

[作者简介] 朱杰, 硕士研究生, E-mail 为 zhujiedem@hotmail.com。王中群, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 wangtsmc@aliyun.com。通讯作者王昭军, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事炎症与冠心病基础与临床研究, E-mail 为 doctorwang1965@163.com。

levels in aortic sections of mice were detected by immunohistochemistry and qRT-PCR respectively. **Results** HE staining demonstrated significant thickening of the intima, with typical atherosclerotic plaque formation in model group mice, and von Kossa staining showed spotty black clumps of aortic calcification under the fibrous cap plaque, while intervention group had atherosclerotic plaques without the formation of significant calcium deposits; The quantitative analysis showed that aortic vascular wall calcium and alkaline phosphatase activity were significantly lower in the intervention group than that of the model group ( $P < 0.01$ ); Immunohistochemical staining showed that TLR2, TLR4 mainly expressed in atherosclerotic plaques, qRT-PCR confirmed that the expression of TLR2 and TLR4 was significantly higher in the model group mice aorta ( $P < 0.05$ ), while the expression level of TLR2 and TLR4 mRNA or protein were significantly lower in intervention group aortic than in the model group. The expression level of TLR2 and TLR4 mRNA in mice aorta tissue was positively related to the content of calcium ( $r = 0.77$  and  $r = 0.79$ , respectively, both  $P < 0.001$ ). **Conclusions** Vitamin K2 can reduce calcium content and alkaline phosphatase activity, and inhibit intimal calcification induced by high-fat diet in ApoE<sup>-/-</sup> mice. The results suggest that the effects of vitamin K2 on calcification of aortic artery may be associated with the regulation for the expression of TLR2 and TLR4.

血管钙化是机体在多种致病因素下,由高钙磷环境以及矿化诱导子上调、抑制子缺失导致的钙盐异常沉积在血管壁的病理过程,常引起动脉粥样硬化复杂病变、充血性心力衰竭、动脉夹层、肢体缺血坏疽,是心脑血管疾病高发病率和高死亡率的重要因素之一<sup>[1]</sup>。目前认为,炎症反应在动脉粥样硬化的进展乃至血管钙化形成过程中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。近来研究认为维生素 K2 可抑制炎症反应,但其对动脉钙化的作用及机制尚未阐明。为此,本研究拟通过构建 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化钙化模型,给予维生素 K2 干预,探讨维生素 K2 对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉组织中内膜钙化及其炎症相关受体 Toll 样受体 2 (TLR2) 和 TLR4 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

18 只 6 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,由北京大学医学部实验动物中心提供[批号为 SCXK(京) 2011-0012]。饲养于无特定病原体(SPF)屏障内,环境温度 19~22℃,相对湿度 50%~70%,小鼠自由摄食及饮水。

小鼠予普通饲料适应性喂养 1 周后,随机分为模型组、维生素 K2 干预组及对照组,每组 6 只。模型组及维生素 K2 干预组小鼠予以高脂饲料(15% 脂肪,1.25% 胆固醇,0.5% 胆酸),对照组小鼠继续予以普通饲料喂养。维生素 K2 干预组小鼠在喂食高脂饮食的基础上同时给予维生素 K2 溶解液灌胃,每天 1 次,共 12 周,给药剂量为 40 mg/(kg·d),每 2 周按体重调整剂量,其余两组给予同样体积丙二醇及净化水混合液灌胃。

于实验第 13 周(小鼠 19 周龄时),所有小鼠禁

食 12 h,1% 戊巴比妥 0.5~1.0 mL 腹腔麻醉,眼眶采血后行安乐死。将主动脉根部至主动脉弓血管取出,去除外膜脂肪组织后用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋后切片,其余胸腹主动脉用去离子水冲掉残存在动脉腔及表面血液,立即置于干净 EP 管中,-80℃ 冰箱冻存储用。

### 1.2 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清脂质水平检测

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠经眼眶采血后,室温静置 1 h,4℃ 下 3000 r/min 离心 10 min,小心吸取上层血清,送江苏大学附属医院检验科 BECKMAN COULTER Au 2700 全自动生物化学仪分析血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDLC)水平。

### 1.3 HE 染色检测主动脉组织形态学变化

取小鼠主动脉根部至主动脉弓血管,10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋连续切片,常规脱蜡、脱水后行苏木素-伊红染色(HE 染色),于光镜下观察拍照。

### 1.4 Von Kossa 染色检测主动脉壁钙化

取小鼠主动脉根部至主动脉弓血管,石蜡切片脱蜡脱水后,置于 5% 硝酸银溶液中,强烈太阳光线下照射 30~60 min,蒸馏水漂洗,5% 硫代硫酸钠溶液定影处理 1 min,中性品红复染、脱水、透明、封片后,于光镜下观察主动脉钙盐沉积情况。

### 1.5 小鼠主动脉组织钙含量及碱性磷酸酶活性测定

取 -80℃ 贮存的主动脉组织(约 10 mg),于 55℃ 彻底烘干,加入 0.6 mmol/L 稀盐酸在 37℃ 脱钙 24 h,盐酸悬液中钙含量用邻甲-酚酞络合酮法测定,按钙检测试剂盒说明书操作,利用比色法检测

血管组织中的钙浓度,以 BCA 法测定蛋白含量,并以蛋白含量标化钙含量。

取主动脉组织(约 10 mg)加入磷酸盐缓冲液后制备匀浆,12000 g 离心 10 min,上清液利用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测。按碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒说明书检测血管组织中 ALP 活性,以  $p$ -硝基苯酚产生量计算并以蛋白含量标化,1 单位表示 30 min 内产生 1 nmol/L 硝基苯酚的活性。

## 1.6 免疫组织化学法检测主动脉组织中 Toll 样受体 2 及 4 蛋白表达

上述石蜡切片常规脱蜡至水,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)进行抗原修复,滴加 5% BSA 封闭液,室温孵育 20 min;滴加兔抗小鼠 TLR2 (1:200)和 TLR4 多克隆抗体(1:300),4℃过夜;滴加聚合 HRP 标记 IgG,37℃孵育 20 min;滴加 DAB 显色液;苏木素复染,1%盐酸水溶液分化,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明后封片,于镜下观察拍照。免疫组织化学结果判断依据阳性细胞密度及免疫显色强度综合计分。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,每视野计数 100 个细胞,计算 TLR2 和 TLR4 阳性细胞百分率。阳性细胞少于 5% 记 0 分;占 5% ~ 25% 记 1 分;占 26% ~ 49% 记 2 分;占 50% ~ 75% 记 3 分。大于 75% 记 4 分。显色强度记 0 ~ 3 分:细胞内无着色记 0 分;细胞内淡黄色记 1 分;棕黄色记 2 分;棕褐色记 3 分;将两项指标评分相加,分 4 级,即阴性(-)为 0 ~ 1 分;弱阳性(+)为 2 ~ 3 分;中等阳性(++)为 4 ~ 5 分;强阳性(+++)大于 5 分。

## 1.7 实时定量 PCR 测定小鼠主动脉 Toll 样受体 2 及 4 mRNA 的表达

利用 Trizol 提取小鼠血管组织中的总 RNA,按

照 Prime Script RT Reagent 试剂盒说明,取 2  $\mu$ L RNA 样本,反应体系 20  $\mu$ L,反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,1 个循环,逆转录合成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq PCR 试剂盒说明进行实时定量 PCR,所用 Real Time PCR 扩增仪为 MX 3000P,TLR2 上游引物为 5'-CCC ACT TCA GGC TCT TTG AC-3',下游引物为 5'-GCC ACT CCA GGT AGG TCT TG-3';TLR4 上游引物为 5'-GGC ATC ATC TTC ATT GTC CTT-3',下游引物为 5'-TGT CCT CCC ATT CCA GGT AG-3';GAPDH 上游引物为 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3',下游引物为 5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3';以上引物由上海生工合成。反应条件为:95℃ 预变性 30 s,然后 95℃ 5 s,60℃ 30 s,循环 40 次。利用检测到的荧光信号,每份标本分别得到扩增曲线和熔点曲线,检测反应的特异性,并得到各自的 Ct 值,各组 PCR 结果均重复 3 次。

## 1.8 统计学方法

计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 16.0 统计分析软件分析数据,三组比较采用 One-way ANOVA 分析并进而采用 Post Hoc LSD 进行显著性检验,采用 Pearson 进行相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠血脂水平

模型组小鼠血清 TC、TG 及 LDLC 含量较对照组均显著升高,HDLC 含量显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,维生素 K2 干预组小鼠血清 TC、LDLC 及 TG 含量明显降低,HDLC 含量升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 各组小鼠血清脂质水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Levels of TG, TC, HDLC, LDLC in each group( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
对照组	0.61 $\pm$ 0.09	11.69 $\pm$ 1.29	3.96 $\pm$ 0.53	11.50 $\pm$ 2.07
模型组	1.02 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	24.25 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	27.22 $\pm$ 6.23 <sup>a</sup>
维生素 K2 干预组	0.87 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	15.33 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	13.25 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较。

### 2.2 不同实验组小鼠主动脉组织形态学变化

模型组小鼠主动脉 HE 染色后血管内膜普遍增厚,出现显著的动脉粥样硬化斑块凸向血管腔,斑块内含大量泡沫细胞、可见针菱形的胆固醇结晶,纤维帽变薄,其下可见粉染的无定形物质以及蓝染的颗粒物沉积,部分弹力板被破坏、断裂。维生素 K2 干预组

小鼠可见粥样硬化斑块,但斑块内未见明显无定形及蓝染物质沉积。对照组小鼠血管内膜可见早期动脉粥样斑块,但无内弹力板破坏(图 1)。

血管 Von Kossa 染色示模型组小鼠血管纤维帽下可见点灶状棕黑色钙化团块,维生素 K2 干预组及对照组小鼠未见明显钙盐沉积(图 2)。

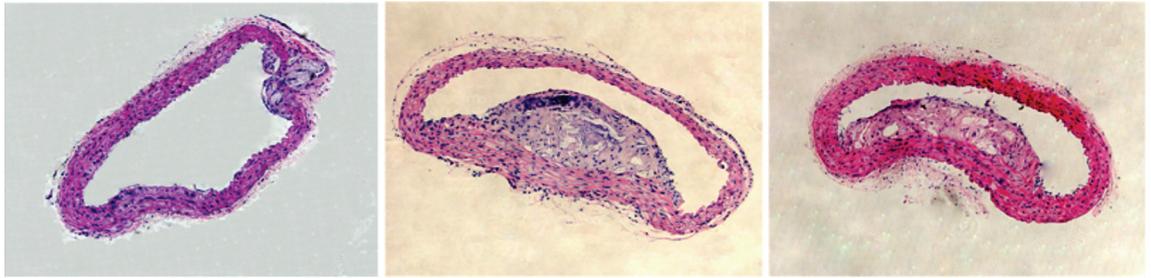


图 1. 小鼠主动脉 HE 染色(100 ×) 从左至右分别为对照组、模型组及维生素 K2 干预组。

Figure 1. Representative photomicrographs of histomorphology in mice aortic cross with HE staining(100 ×)



图 2. 小鼠主动脉 Von Kossa 染色(200 ×) 从左至右分别为对照组、模型组及维生素 K2 干预组;箭头所指黑色团块为钙沉积部位。

Figure 2. Representative photomicrographs of calcium deposition in mice aorta after Von Kossa staining(200 ×)

### 2.3 小鼠主动脉组织钙含量及碱性磷酸酶活性

模型组主动脉组织钙含量及 ALP 活性较对照组分别增加 19.8 倍( $264.80 \pm 26.02 \mu\text{mol/g}$  比  $13.37 \pm 1.94 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.01$ ) 和 13.7 倍( $172.50 \pm 18.89 \text{ U/g}$  比  $12.55 \pm 2.39 \text{ U/g}$ ,  $P < 0.01$ ); 维生素 K2 干预组较模型组钙含量及 ALP 活性分别减少 3.6 倍( $72.47 \pm 10.28 \mu\text{mol/g}$  比  $264.80 \pm 26.02 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.01$ ) 和 3.4 倍( $50.07 \pm 4.82 \text{ U/g}$  比  $172.50 \pm 18.89 \text{ U/g}$ ,  $P < 0.01$ ); 表 2)。

### 2.4 免疫组织化学法检测小鼠 Toll 样受体 2 及 4 蛋白表达水平

免疫组织化学法检测 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉 TLR2 和 TLR4 蛋白表达水平, 结果显示, 对照组小鼠主动脉斑块内 TLR2 和 TLR4 蛋白呈微量表达(棕

黄色), 模型组 TLR2 和 TLR4 蛋白的阳性表达量较对照组小鼠显著增强(均  $P < 0.01$ ), 而维生素 K2 干预组小鼠主动脉斑块内 TLR2 和 TLR4 蛋白表达较模型组降低, 其差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ ; 表 3 和图 3)。

表 2. 小鼠主动脉血管钙含量及碱性磷酸酶活性变化( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2. The levels of calcium content, activity of ALP in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	钙含量( $\mu\text{mol/g}$ )	ALP 活性(U/g)
对照组	$13.37 \pm 1.94$	$12.55 \pm 2.39$
模型组	$264.80 \pm 26.02^a$	$172.50 \pm 18.89^a$
维生素 K2 干预组	$72.47 \pm 10.28^{ab}$	$50.07 \pm 4.82^{ab}$

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 3. 各组小鼠主动脉组织中 Toll 样受体 2 及 4 免疫组织化学分析结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Immunohistochemical analysis of TLR2 and TLR4 in the mice aorta of each group( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	阳性细胞率		表达强度	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
对照组	$2.3\% \pm 0.5\%$	$3.3\% \pm 0.5\%$	阴性(-)	阴性(-)
模型组	$47.5\% \pm 12.4\%^a$	$62.5\% \pm 13.4\%^a$	中等阳性(++)	强阳性(+++)
维生素 K2 干预组	$21.7\% \pm 10.3\%^b$	$36.1\% \pm 12.0\%^b$	弱阳性(+)	弱阳性(+)

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

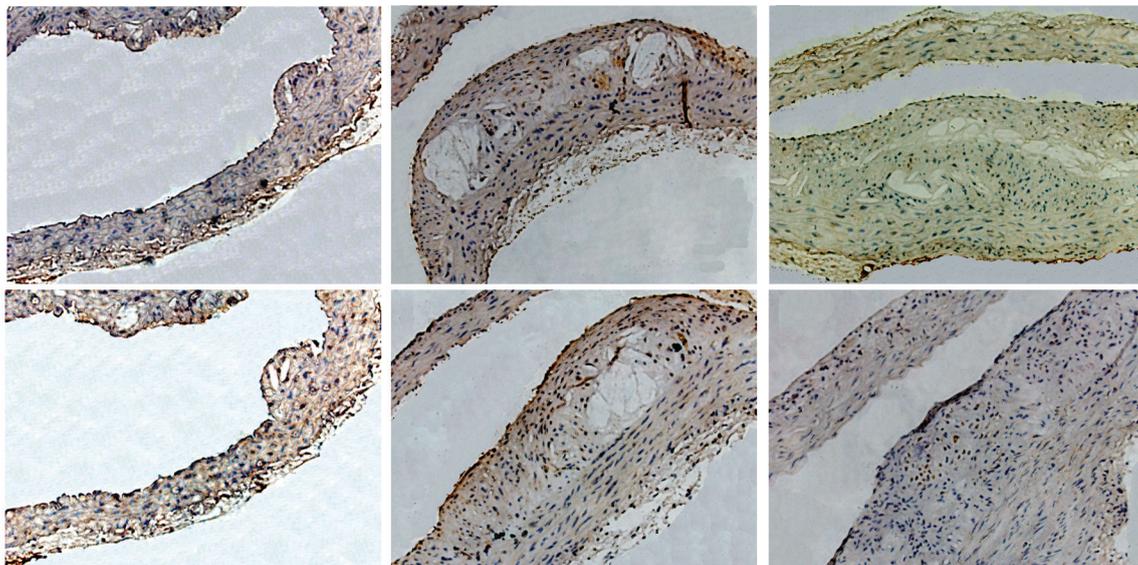


图 3. 免疫组织化学法示各组小鼠 TLR2(上图)及 TLR4(下图)蛋白表达水平(200×) 从左到右依次为对照组、模型组和维生素 K2 干预组。

Figure 3. Representative photomicrographs of mice aorta from control group, model group and interventional group after immunohistochemical staining for TLR2 and TLR4 respectively(200×)

### 2.5 小鼠主动脉壁 Toll 样受体 2 及 4 mRNA 的表达

实时定量 PCR 测定结果显示,模型组小鼠的主动脉 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达最高,对照组小鼠表达最低,维生素 K2 干预组小鼠 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达较模型组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 4)。

### 2.6 小鼠主动脉组织钙含量与 Toll 样受体 2 及 4 mRNA 表达的相关性

小鼠主动脉钙含量与 TLR2 mRNA 表达呈正相

关( $r = 0.77, P < 0.001$ ),与 TLR4 mRNA 表达亦呈正相关( $r = 0.79, P < 0.001$ ;图 4)。

表 4. 小鼠主动脉中 Toll 样受体 2 及 4 mRNA 表达

Table 4. The expression of TLR2 and TLR4 mRNA in the mice aorta

分 组	TLR2 mRNA( $\times 10^{-3}$ )	TLR4 mRNA( $\times 10^{-3}$ )
对照组	8.19 ± 1.49	46.87 ± 8.19
模型组	31.16 ± 7.22 <sup>a</sup>	84.71 ± 21.66 <sup>a</sup>
维生素 K2 干预组	21.32 ± 1.33 <sup>b</sup>	54.15 ± 9.73 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较。

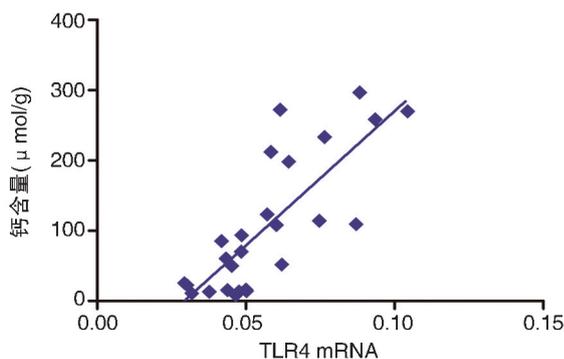
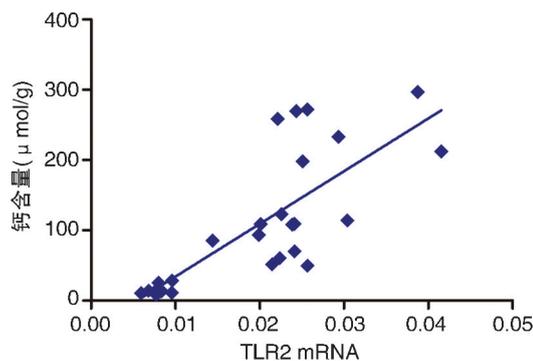


图 4. 小鼠主动脉组织钙含量与 Toll 样受体 2 及 4 mRNA 表达的相关性

Figure 4. The correlation of calcification with the level of TLR2 and TLR4 mRNA

## 3 讨 论

血管钙化是发生在心血管系统的异常矿化,是

冠状动脉粥样硬化、高血压、糖尿病和衰老等普遍的、共同的病理生理表现。新近的研究发现,高脂血症及慢性炎症能够损伤血管内皮细胞,引起血管

内皮功能紊乱,募集以单核细胞为主的白细胞向血管内皮趋化、黏附和迁移,单核细胞游移至内皮下摄取氧化型低密度脂蛋白,转变为激活的巨噬细胞后能够分泌大量的炎症因子,如白细胞介素 6 (IL-6)、高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等<sup>[3,4]</sup>,活化炎症细胞的聚集及炎症因子的过度激活,参与了动脉粥样硬化的进展及血管钙化的发生<sup>[5]</sup>。本研究通过高脂高胆固醇饮食喂养,成功诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠建立动脉粥样硬化并血管钙化模型,小鼠血脂水平明显升高,主动脉内膜出现显著的动脉粥样斑块伴有局灶钙盐沉积,提示高脂血症不仅是动脉粥样硬化的危险因素,也是血管钙化的重要原因<sup>[6]</sup>。

TLR 属于介导天然免疫的 I 型跨膜受体,其中 TLR2 和 TLR4 是 TLR 家族中的重要成员,能够识别内、外源性的配体后激活核因子  $\kappa$ B 途径诱导炎症因子表达,介导固有免疫与获得性免疫的发生。已有许多研究证实 TLR 在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用。Shinohara 等<sup>[7]</sup> 研究结果显示,TLR2 和 TLR4 的共刺激作用可激活核因子  $\kappa$ B 表达,诱导产生 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ ,导致内皮功能紊乱,促进单核细胞聚集和平滑肌细胞的凋亡,加速动脉粥样硬化的进程。近来研究表明,TLR 与心脏瓣膜钙化有关。有研究报道用脂多糖刺激人主动脉瓣间质细胞中 TLR4 能上调炎症介质和骨形成蛋白 2 (BMP-2) 水平<sup>[8]</sup>。本研究采用免疫组织化学法及实时荧光定量 PCR 法检测血管壁组织中 TLR2 及 TLR4 蛋白及基因水平的表达,结果显示,高脂诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉 TLR2 和 TLR4 蛋白及基因表达水平较对照组小鼠都显著增强,这一结果提示 TLR2 和 TLR4 表达增强可能促进了血管钙化的发生,这一结论与 Lee 等<sup>[9]</sup> 研究结果相一致。因此对抗炎机制的研究将有助于寻找与钙化相关疾病治疗的新靶点。

维生素 K 自上个世纪 30 年代被丹麦营养生物学家 Henrik Dam 发现以来,其作用仅限于对凝血系统的影响。新近研究发现,维生素 K 作为谷氨酸  $\gamma$ -羧化酶的辅酶,能够介导基质 Gla 蛋白 (MGP) 羧化,而羧化的 MGP 蛋白是强效的血管钙化抑制因子。Luo 等<sup>[10]</sup> 发现敲除 MGP 基因的小鼠在出生后 8 周均死于广泛的动脉钙化及其并发症。华法令能够阻碍维生素 K 依赖性的谷氨酸  $\gamma$  羧化,阻碍 Gla 形成,导致体内一些含 Gla 的钙调节蛋白如 MGP 不能充分发挥其生物活性,从而破坏维持血管完整的保

护机制,促进心血管系统异位钙化的发生<sup>[11]</sup>。通过大剂量的维生素 K 饮食能够逆转由华法令引起的血管钙化情况<sup>[12]</sup>。流行病学研究表明,维生素 K 缺乏在老年人,尤其是在血管钙化和骨质疏松症患者中很常见,干预性的补充维生素 K 可以显著降低血管钙化的发生率<sup>[13,14]</sup>。现有研究表明,维生素 K 能够抑制脂多糖诱导的炎症反应中 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达<sup>[15,16]</sup>。

本研究建立了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血管钙化模型,予维生素 K2 进行灌胃干预,研究发现,维生素 K2 干预组血管斑块处未见钙盐沉积,血管组织钙含量和 ALP 的活性较模型组显著降低。ALP 是钙化形成的标志因子,能够提高磷酸盐的浓度,为羟磷灰石结晶形成提供底物,还可以水解焦磷酸盐,解除后者对磷酸钙生成的抑制,主动脉血管壁中钙化标志因子表达的降低验证了维生素 K2 能够抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血管钙化的形成。同时本研究发现,维生素 K2 干预组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的主动脉 TLR2 和 TLR4 蛋白及基因表达较模型组都明显降低,但两者之间是相互伴随关系还是因果关系,目前尚不能明确,我们推断,维生素 K2 可能通过抑制 TLR2 和 TLR4 的表达减少免疫炎症反应的发生和进展,从而抑制了炎症因子的释放及其后的放大效应最终抑制血管钙化的形成。但我们的研究未能特异性的刺激或阻断 TLR2 及 TLR4 后观察血管钙化形态学及钙化相关因子的表达,有待后期动物和细胞水平的实验进一步研究。

总之,我们的实验证实,高脂饮食小鼠血管钙化组织中 TLR2 及 TLR4 表达增加,维生素 K2 可降低 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血管组织中钙含量和 ALP 活性,减少主动脉血管壁 TLR2、TLR4 的表达,提示维生素 K2 可能通过下调血管壁中 TLR2、TLR4 的表达而抑制动脉粥样硬化内膜钙化。本研究结果有望为血管钙化的防治提供新的思路和线索。

#### [参考文献]

- [1] Wang ZQ, Jiang YC, Liu NF, et al. Advanced glycation end-product N $\epsilon$ -carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387-396.
- [2] Li JJ, Zhu CG, Yu B, et al. The role of inflammation in coronary artery calcification[J]. *Ageing Res Rev*, 2007, 6(4): 263-270.
- [3] Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, et al. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in athero-

- sclerosis[J]. *J Inflamm*, 2011, 8(9): 1-17.
- [4] 仲英洁, 张子为, 徐郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉粥样硬化和钙化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 305-310.
- [5] Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, et al. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective[J]. *Hypertension*, 2010, 55(3): 579-592.
- [6] 王中群, 刘乃丰. 血管钙化形成与消退机制的新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(10): 833-836.
- [7] Shinohara M, Hirata K, Yamashita T, et al. Local overexpression of toll-like receptors at the vessel wall induces atherosclerotic lesion formation: synergism of TLR2 and TLR4[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2384-391.
- [8] Babu A, Meng XZ, Zou N, et al. Lipopolysaccharide stimulation of human aortic valve interstitial cells activates inflammation and osteogenesis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86(1): 71-76.
- [9] Lee JH, Meng X, Weyant MJ, et al. Stenotic aortic valves have dysfunctional mechanisms of anti-inflammation; implications for aortic stenosis[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(2): 481-486.
- [10] Luo G, Ducy P, Mckee MD et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix gla protein[J]. *Nature*, 1997, 386(6620): 78-81.
- [11] Rennenberg RJ, van Varik BJ, Schurgers LJ, et al. Chronic coumarin treatment is associated with increased extra-coronary arterial calcification in humans [J]. *Blood*, 2010, 115(24): 5121-123.
- [12] Zhang YT, Tang ZY. Research progress of warfarin-associated vascular calcification and its possible therapy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(1): 76-82.
- [13] Van den Heuvel EG, van Schoor NM, Lips P, et al. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease [J]. *Maturitas*, 2014, 77(2): 137-141.
- [14] Beulens JW, Bots ML, Atsma F, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2): 489-493.
- [15] Mizushima Y, Maeda J, Irin Y, et al. Effects of intermediates between vitamins K(2) and K(3) on mammalian DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(2): 1115-132.
- [16] Ohsaki Y, Shirakawa H, Hiwatashi K, et al. Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(4): 926-932.

(此文编辑 许雪梅)