

BMP 信号通路在华法林诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化中的作用

张俊霞, 徐金升, 张睦清, 白亚玲, 张胜雷, 崔立文, 张慧然

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 华法林; 细胞钙化; 骨形态发生蛋白信号通路

[摘要] 目的 探讨骨形态发生蛋白(BMP)信号通路在华法林诱导的大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)钙化中的作用。方法 体外分离培养大鼠胸主动脉 VSMC, 将其随机分为正常对照组、高磷组、华法林(10 $\mu\text{mol/L}$) 干预组及华法林(10 $\mu\text{mol/L}$)+维生素 K(10 $\mu\text{mol/L}$) 干预组。对细胞进行钙含量和碱性磷酸酶(ALP)活性检测, 茜素红染色检测钙结节, Western blot 检测细胞中 Runx2 蛋白的表达变化, RT-PCR 检测细胞中骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、Smad1 及 Runx2 的表达变化。结果 茜素红染色结果显示, 与正常对照组和高磷组相比, 华法林干预组钙化结节明显增多; 钙含量测定结果与茜素红染色结果基本一致。与正常对照组和高磷组相比, 华法林干预组 ALP 活性明显增加($P<0.05$), Runx2 mRNA 和蛋白表达水平及 BMP-2、Smad1 mRNA 表达明显增高($P<0.05$); 与华法林干预组相比, 华法林+维生素 K 干预组细胞钙含量、ALP 活性及 BMP-2、Smad1、Runx2 的表达均明显降低($P<0.05$)。结论 BMP 信号通路参与了华法林促进的大鼠 VSMC 钙化, 其可能的作用机制是介导了 VSMC 的表型转化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of BMP Signaling Pathway in Warfarin-induced Calcification of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

ZHANG Jun-Xia, XU Jin-Sheng, ZHANG Mu-Qing, BAI Ya-Ling, ZHANG Sheng-Lei, CUI Li-Wen, and ZHANG Hui-Ran

(Department of Nephrology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Warfarin; Cell Calcification; BMP Signaling Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether warfarin promotes calcification of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) through the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway. **Methods** Vascular smooth muscle cells were obtained from rat aortic, and identified by immunocytochemistry, then randomly divided into control group, high phosphorus group, warfarin (10 $\mu\text{mol/L}$) group, warfarin (10 $\mu\text{mol/L}$)+vitamin K (10 $\mu\text{mol/L}$) group. Calcification staining, calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity were measured, the expression of Runx2 protein was detected by Western blot and the expression of BMP-2, Smad1, Runx2 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The results of alizarin red stain were shown that the number of calcified nodules in the warfarin group was significantly higher than that in the control and high phosphorus group ($P<0.05$). The results of calcium content were in line with that of alizarin red stain. The ALP activity in the warfarin group was significantly higher than that in the control and high phosphorus group ($P<0.05$). The results of RT-PCR and Western blot were shown that the expression level of Runx2, BMP-2 and Smad1 in the warfarin group was significantly higher than that in the control and high phosphorus group ($P<0.05$). However, the calcification content, ALP activity and the expression level of BMP-2, Smad1 and Runx2 in the warfarin+vitamin K group were significantly lower than those in the warfarin group ($P<0.05$). **Conclusion** The BMP pathway was involved in warfarin-induced vascular calcification of rat vascular smooth muscle cells, which may be achieved by promoting the trans-

[收稿日期] 2014-08-13

[修回日期] 2016-04-18

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(H2012206157)

[作者简介] 张俊霞, 硕士, 副主任医师, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制, E-mail 为 sun6025@sina.com。通讯作者徐金升, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制, E-mail 为 xjs5766@126.com。白亚玲, 博士, 主任医师, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制, E-mail 为 snbyl@163.com。

differentiation of vascular smooth muscle cells.

动脉中膜钙化是慢性肾脏病及糖尿病患者常见的病理现象,可导致动脉硬化而引起心血管事件的发生。华法林是目前国内外最常用的长效抗凝剂,众多报道均证实,它是导致血管钙化的一个主要危险因素^[1-5]。但其对血管钙化的影响及机制仍未完全阐明。体外研究表明,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号通路的激活可促使磷向血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)内转运及 Runx2 的表达,以及降低 miRNA-30b 及 miRNA-30c 的表达,进而促进血管钙化的发生^[6-8]。然而, BMP 信号通路是否在华法林促进血管钙化中起到了作用,目前国内外尚缺乏相关研究。因此,本研究采用体外实验方法,探讨华法林和维生素 K 对大鼠胸主动脉 VSMC 钙化的影响,以及 BMP 信号通路在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

体重 80~100 g 健康雄性 SD 大鼠(河北省实验动物中心,合格证标号为 1305090)。维生素 K₂、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);华法林(美国 Cayman 公司);钙含量测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);PCR 引物(上海英潍捷基贸易有限公司);鼠抗鼠 Runx2 单克隆抗体(英国 ABCAM 公司);倒置相差显微镜 LH50A 型(日本 Olympus 公司);酶标仪 HT2 型(奥地利 Anthos 公司);SP 免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(中山金桥股份有限公司)。

1.2 大鼠 VSMC 原代培养及实验分组

取大鼠 1 只,戊巴比妥钠麻醉后用 75%酒精浸泡,在无菌条件下分离出胸主动脉,剥去外膜,纵向剪开管壁,然后用纱布轻轻擦除内膜,将中膜剪成 1 mm³左右的小块,加入培养液(DMEM,添加 10% FBS、4 mmol/L 谷氨酰胺、10 万 IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素),置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,24 h 后更换新鲜培养液,此后每 2~3 天换液 1 次,倒置相差显微镜下观察细胞生长状况,当细胞汇合接近 80%~90% 时进行传代。此后每 3~4 天传代 1 次。后将 VSMC 随机分为正常对照组、高磷组、华法林(10 μmol/L)干预组及华法林(10 μmol/L)+维生素 K(10 μmol/L)干预组,正常对照组采用含

10%胎牛血清培养,高磷组采用含 10 mmol/L β-甘油磷酸的高磷培养基培养,华法林干预组在高磷培养基的基础上加入 10 μmol/L 华法林,华法林+维生素 K 干预组在高磷培养基的基础上加入 10 μmol/L 华法林及 10 μmol/L 维生素 K,每 2 天换液 1 次。

1.3 细胞鉴定

倒置显微镜下,大鼠胸主动脉组织块贴壁 3~4 天后可见细胞从组织块边缘爬出,细胞为梭形或不规则三角形,胞质向外伸出 2~3 个长短不等的突起,呈束状排列,5~6 天成漩涡状,形成明显的细胞生长晕,并围绕组织块边缘呈束状向外呈放射状延伸,约 6~7 天后汇合成片,相互重叠生长,呈典型的“峰-谷”样表现。用平滑肌肌动蛋白抗体进行免疫细胞化学法检测可见细胞胞浆表达强阳性。传代纯化,细胞生长特性未见异常改变。

1.4 茜素红染色

取第 3 代细胞接种于 12 孔板内,分别给予不同刺激后,于第 14 天弃去上清,用 95%乙醇室温固定 20~30 min,置于茜素红(0.1%, pH8.3)染液中 37℃温箱孵育 30 min,倒置显微镜下观察并记录。结果判断标准:钙盐沉积为橘红色。每组设 3 个复孔。

1.5 细胞内钙含量测定

取第 3 代细胞以 5×10⁴ 个/孔密度接种于 12 孔板,干预 14 天后,细胞用盐酸脱钙取上清,用钙定量检测试剂盒测定钙含量。脱钙后的细胞用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1% SDS 溶解 30 min,BCA 法测定细胞蛋白含量。实验每组设 3 个复孔。

1.6 细胞 ALP 活性测定

取第 3 代细胞以 5×10⁴ 个/孔密度接种于 12 孔板,干预 14 天后,弃去培养液,用 PBS 洗涤细胞,加入 0.1% Triton X-100 每孔 500 μL,4℃约 24 h,然后反复吹打细胞后置于离心管中离心,取上清用试剂盒进行测定,于酶标仪 492 nm 波长处测量。

1.7 RT-PCR 检测大鼠 VSMC 中 Runx2 mRNA 的表达

细胞总 RNA 提取采用 Trizol 一步法。引物序列由 Primer 5.0 软件设计:Runx2 上游引物为 5'-CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT-3',下游引物为 5'-CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC-3',产物大小为 289 bp; BMP-2 上游引物为 5'-ACT CGA AAT TCC CCG TGA CC-3',下游引物为 5'-CCA CTT CCA CCA CGA ATC CA-3',产物大小为 106 bp; Smad1 上游引物为 5'-GGT GAC TGG GAA CGG ATC G-3',下游引物为 5'-TGG TCT TCG GTT CGG AAA GG-3',产物大小为 144 bp; GAPDH 上游引物为 5'-CCC ACT

AAA GGG CAT CCT GG-3', 下游引物为 5'-GGC CCC TCC TGT TGT TAT GG-3', 产物大小为 352 bp。应用 RT-PCR 检测, 实验重复 3 次, 以 GAPDH 作为内对照, 计算相对含量。

1.8 Western blot 检测 Runx2 蛋白的表达

取干预 3 天的细胞, 按常规方法提取蛋白质并用 BCA 法进行蛋白定量, SDS-PAGE 分离, 转膜、封闭, 加一抗 (β -actin 1 : 1000, Runx2 1 : 500) 稀释液, 4℃ 孵育过夜。洗膜, 加入荧光二抗稀释液 (1 : 2000), 室温下孵育 2 h, 用免疫荧光成像系统显色, 图像分析软件扫描条带灰度值, 计算 Runx2 蛋白的相对表达, 实验重复 3 次。

1.9 统计学方法

正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间均数两两比较用 S-N-

K 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 华法林对高磷诱导的大鼠 VSMC 钙化和 ALP 活性的影响

茜素红染色显示, 高磷组橘红色钙化结节明显多于正常对照组; 与高磷组相比, 华法林干预组橘红色钙化结节明显增多, 华法林+维生素 K 干预组橘红色钙化结节无明显变化 (图 1)。钙含量测定结果与茜素红染色结果基本一致 (图 2)。与正常对照组相比, 高磷组、华法林干预组和华法林+维生素 K 干预组 ALP 活性明显增强 ($P < 0.05$), 其中华法林干预组 ALP 活性最强; 与华法林干预组相比, 华法林+维生素 K 干预组 ALP 活性降低 ($P < 0.05$; 图 3)。

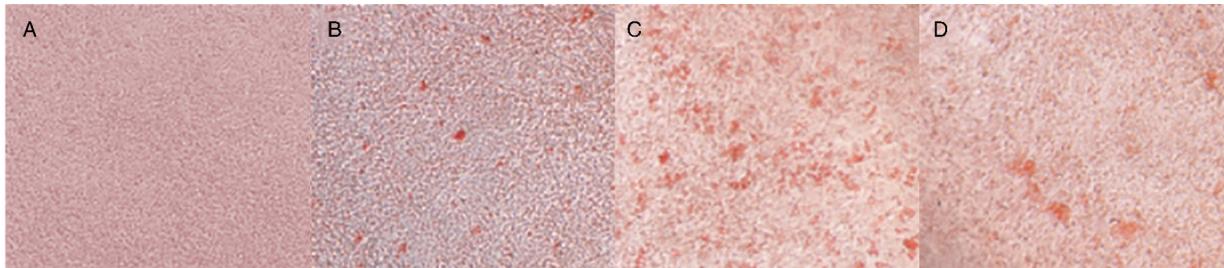


图 1. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞茜素红染色 (100×) A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为华法林干预组, D 为华法林+维生素 K 干预组。

Figure 1. Alizarin red staining of rat thoracic aortic smooth muscle cells (100×)

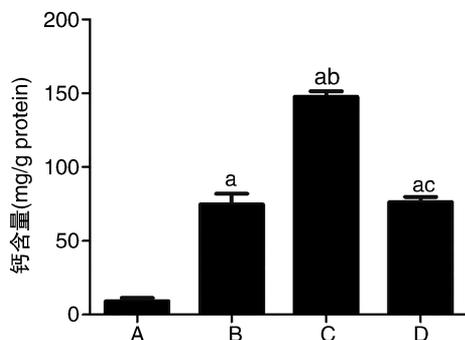


图 2. 大鼠血管平滑肌细胞钙含量的变化 A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为华法林干预组, D 为华法林+维生素 K 干预组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高磷组比较; c 为 $P < 0.05$, 与华法林干预组比较。

Figure 2. Changes of calcium content in rat vascular smooth muscle cells

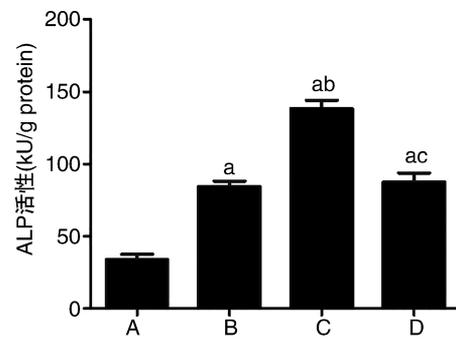


图 3. 大鼠血管平滑肌细胞碱性磷酸酶活性的变化 A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为华法林干预组, D 为华法林+维生素 K 干预组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高磷组比较; c 为 $P < 0.05$, 与华法林干预组比较。

Figure 3. Changes of ALP activity in rat vascular smooth muscle cells

2.2 华法林对高磷诱导的大鼠 VSMC 中 Runx2、BMP-2 和 Smad1 表达的影响

华法林干预组 Runx2 mRNA 和蛋白表达明显高于高磷组和华法林+维生素 K 干预组 ($P < 0.05$; 图

4)。与正常对照组相比, 高磷组、华法林干预组和华法林+维生素 K 干预组 BMP-2 和 Smad1 mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05$), 其中华法林干预组 BMP-2 和 Smad1 mRNA 表达最高; 与华法林干预组相比,

华法林+维生素 K 干预组 BMP-2 和 Smad1 mRNA 表达降低($P<0.05$;图 5)。

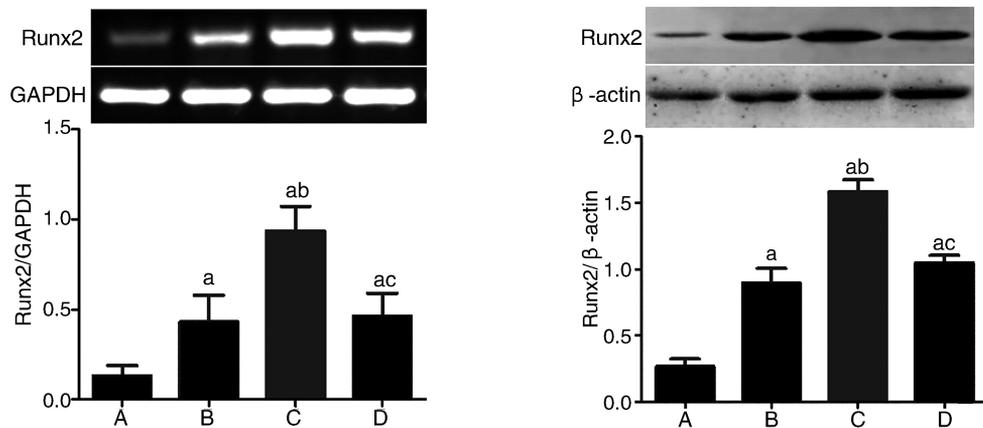


图 4. 大鼠血管平滑肌细胞 Runx2 mRNA 和蛋白的表达 A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为华法林干预组, D 为华法林+维生素 K 干预组。a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高磷组比较; c 为 $P<0.05$, 与华法林干预组比较。

Figure 4. Expression of Runx2 mRNA and protein in rat vascular smooth muscle cells

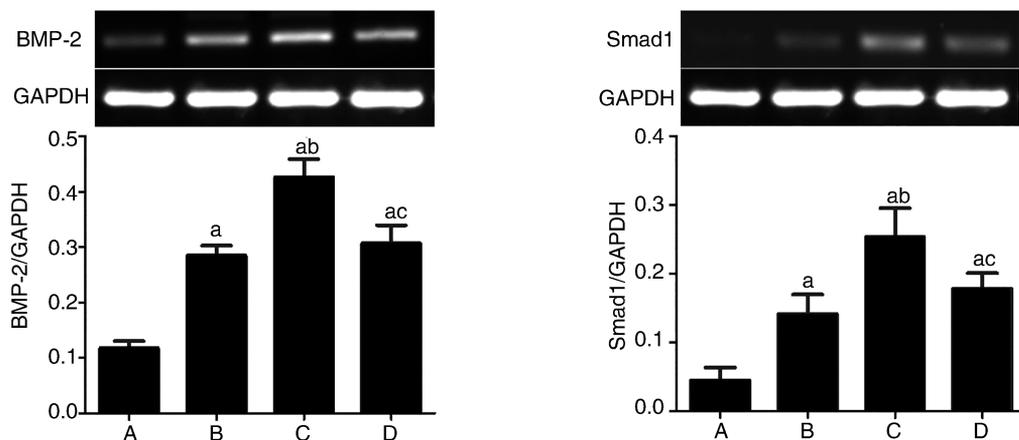


图 5. 大鼠血管平滑肌细胞 BMP-2 和 Smad1 mRNA 的表达 A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为华法林干预组, D 为华法林+维生素 K 干预组。a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高磷组比较; c 为 $P<0.05$, 与华法林干预组比较。

Figure 5. Expression of BMP-2 and Smad1 mRNA in rat vascular smooth muscle cells

3 讨论

华法林是 VSMC 成骨成软骨分化的增强剂而不是诱导剂, 因为一定含量的磷在华法林诱导的 VSMC 钙化中是必须的^[9]。因此, 本文以高磷诱导的大鼠 VSMC 为模型, 研究了华法林在血管钙化中的作用。通过茜素红染色和钙含量的测定, 笔者发现高磷可以促进血管钙化, 华法林可以增强这一过程, 此过程在加入维生素 K 后被抑制, 进一步印证了华法林对血管钙化的增强作用。

血管钙化不是一被动的过程, 而是由细胞介导的、高度可调的过程, 其中 VSMC 的成骨成软骨表型转化起着关键作用^[10]。Runx2 是表型转化的关键

因子^[10-11], 可以调控钙化和 ALP 等成骨成软骨标志物的表达。ALP 是成骨成软骨细胞分化早期(增殖期)的指标, 它随细胞分化活性增强。为了证实华法林是否与 VSMC 表型转化直接相关, 本研究检测了大鼠 VSMC 中 Runx2 的表达及 ALP 活性, 结果发现, 高磷上调了 Runx2 的表达及 ALP 活性, 而华法林增强了这一过程, 给予维生素 K 后可抑制此过程。这些结果提示华法林是促进了 VSMC 成骨成软骨样表型转化。

华法林是一种抗凝剂, 在美国的处方量已经超过 2500 万^[12], 研究表明, 维生素 K 对血管钙化有一定的抑制作用^[13], 而华法林是目前唯一临床应用的维生素 K 拮抗剂, 可通过干扰维生素 K 环氧化物向

还原型维生素 K 转换,影响维生素 K 循环,抑制维生素 K 依赖性羧基化,进而影响基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP)活化^[14]。在 MGP^{tg/wt}、ApoE^{-/-}的小鼠中, pSmad1/5/8 的表达减弱,而在 MGP^{-/-}小鼠中 pSmad1/5/8 的表达增强,说明 MGP 是 BMP 通路的抑制基因^[15]。而 BMP 信号通路又在 VSMC 表型转化中起着关键性的作用^[16-17], BMP 超家族与 I 型和 II 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合后,能激活 Smad1/5/8, 发生磷酸化的 Smad1/5/8 与 Smad4 结合后转位至细胞核内,通过与不同的 DNA 连接蛋白结合调控下游相关的基因转录,从而影响细胞的表型转化^[18]。为进一步研究 BMP 通路在华法林促进 VSMC 成骨成软骨表型转化中的作用,本研究检测了 BMP-2 和 BMP 信号通路效应基因 Smad1 mRNA 表达,结果发现,与高磷组和华法林+维生素 K 干预组相比,华法林干预组上调了 BMP-2 mRNA 及其下游的 Smad1 mRNA 的表达,提示 BMP 通路参与了华法林促进的 VSMC 成骨成软骨样表型转化。

综上所述,在 VSMC 钙化过程中,华法林上调了 BMP 信号通路相关基因的表达,进而促进了 VSMC 成骨成软骨样表型转化,表现为 Runx2 表达增加, ALP 活性升高,进而促进了 VSMC 钙化,提示 BMP 通路参与了华法林诱导的 VSMC 表型转化及钙化过程。这些结果为深入阐明华法林促进 VSMC 成骨成软骨分化的分子机制提供了新的实验依据,也为以后华法林的临床应用提供了一个新的理论基础,同时,也提示我们寻找一种新型的抗凝药已迫在眉睫。

[参考文献]

- [1] Palaniswamy C, Sekhri A, Aronow WS, et al. Association of warfarin use with valvular and vascular calcification: a review[J]. Clin Cardiol, 2011, 34 (2): 74-81.
- [2] Fusaro M, Crepaldi G, Maggi S, et al. Bleeding, vertebral fractures and vascular calcifications in patients treated with warfarin: hope for lower risks with alternative therapies[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2011, 9 (6): 763-769.
- [3] Fusaro M, Tripepi G, Noale M, et al. Prevalence of vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality in warfarin treated hemodialysis patients[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13 (2): 248-258.
- [4] Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, et al. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment[J]. Am J Hypertens, 2003, 16 (2): 103-110.
- [5] Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, et al. Tissue-specific

utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats[J]. J Vasc Res, 2003, 40 (6): 531-537.

- [6] 邓璧, 李元建. MicroRNA 与心血管重构[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (3): 224-229.
- [7] Li X, Yang HY, Giachelli CM, et al. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2008, 199 (2): 271-277.
- [8] Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification[J]. J Am Heart Assoc, 2012, 1 (6): e003905.
- [9] Beazley KE, Deasey S, Lima F, et al. Transglutaminase 2-mediated activation of beta-catenin signaling has a critical role in warfarin-induced vascular calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32 (1): 123-130.
- [10] Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24 (2): 179-189.
- [11] 张俊霞, 徐金升, 朱荣芳, 等. 慢性肾衰竭大鼠主动脉弹性功能与血管基质金属蛋白酶 2 表达及钙化间的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (2): 115-120.
- [12] Johnson JA. Warfarin pharmacogenetics: a rising tide for its clinical value[J]. Circulation, 2012, 125 (16): 1964-966.
- [13] 陈雪英, 杨雅, 游志刚, 等. 维生素 K2 对老年去卵巢大鼠血管钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (3): 197-202.
- [14] Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Reutelingsperger, vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization[J]. Trends Mol Med, 2013, 19 (4): 217-226.
- [15] Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification[J]. Circ Res, 2010, 107 (4): 485-494.
- [16] Chen NX, Duan D, O'Neill KD, et al. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells[J]. Kidney Int, 2006, 70 (6): 1046-053.
- [17] 齐永芬. 血管钙化发病机制研究新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 280-281.
- [18] Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, et al. BMP signaling in vascular diseases[J]. FEBS Lett, 2012, 586 (14): 1993-2002.

(此文编辑 文玉珊)