

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-07-0668-05

内质网应激介导了高糖引起的血管平滑肌细胞钙化

郭润民¹, 刘畅¹, 吴斌¹, 李兴岳¹, 姜佳美¹, 游琼¹, 胡洁芬², 朱强³, 吴铿¹

(1. 广东医学院附属医院心血管内科, 广东省湛江市 524001; 2. 广东省人民医院内分泌科, 广东省广州市 518001;

3. 湖北省襄阳市第一人民医院心血管内科, 湖北省襄阳市 441000)

[关键词] 高糖; 内质网应激; 血管平滑肌细胞; 血管钙化

[摘要] 目的 探讨内质网应激是否介导了高糖引起的血管平滑肌细胞(VSMC)钙化。方法 体外高糖(35 $\mu\text{mol/L}$ D-葡萄糖)处理 VSMC 模拟糖尿病环境, 观察高糖是否引起 VSMC 内质网应激反应和凋亡, 探索高糖是否引起 VSMC 表型转化(收缩型转变为成骨样细胞), 观察内质网应激诱导剂和抑制剂对 VSMC 钙化的影响, 碱性磷酸酶(ALP)活性、钙沉积和骨分化转录因子(Runx2 和 Osterix)通过比色法、O-cresolphthalein 法和 Western blot 测定。结果 应用 35 $\mu\text{mol/L}$ D-葡萄糖分别处理 VSMC 不同时间, 可以上调 VSMC 内质网应激标志蛋白表达、ALP 活性、钙沉积和骨分化标志蛋白; 然而, 4-PBA 预处理抑制 VSMC 内质网应激反应的同时, 也能阻断高糖引起的 VSMC 钙化, 表现为 ALP 活性、钙沉积和骨分化标志蛋白下降。结论 高糖可以激活 VSMC 的内质网应激和凋亡, 进而促 VSMC 钙化的发生, 提示可能内质网应激介导了此激活过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Endoplasmic Reticulum Stress Mediates High Glucose-induced Calcification of Vascular Smooth Muscular Cells

GUO Run-Min¹, LIU Chang¹, WU Bin¹, LI Xing-Yue¹, JIANG Jia-Mei¹, YOU Qiong¹, HU Jie-Fen², ZHU Qiang³, and WU Keng¹

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 2. Department of Endocrinology, Guangdong General Hospital, Guangzhou, Guangdong 518001, China; 3. Department of Cardiology, Xiangyang No. 1 People's Hospital, Xiangyang, Hubei 441000, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Endoplasmic Reticulum Stress; Vascular Smooth Muscle Cell; Vascular Calcification

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether high blood glucose-induced vascular calcification in diabetes mellitus is caused by the endoplasmic reticulum(ER) response and subsequent apoptosis. **Methods** We examined the effects of high glucose on the ER stress response and calcification of vascular smoothmuscle cells (VSMC). Alkaline phosphatase (ALP) activity, calcium content and osteogenic markers expression was measured by colorimetric assay, o-cresolphthalein method and Western blot analysis. **Results** High glucose induced osteoblastic differentiation and ER stress of VSMC, as evidenced by ALP activity, calcium content and osteogenic markers expression increase. 4-PBA treatment could inhibit ER stress and apoptosis of VSMC, therefore, high glucose-elicited VSMC calcification was retarded. **Conclusion** High glucose can activate ER stress and osteoblastic differentiation in VSMC, ER stress and apoptosis might mediate VSMC calcification induced by high glucose.

心血管系统钙化尤其是血管钙化(vascular calcification, VC)是心血管疾病晚期高发病率和高病死

[收稿日期] 2015-09-21

[修回日期] 2015-11-09

[基金项目] 广东省自然科学基金博士启动项目(2015A030310359); 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目(2014A01033); 广东省重大科技专项(2012A080202020); 湛江市第二批科技计划项目(2012C0303)

[作者简介] 郭润民, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, 尤其着重于糖尿病心血管并发症防治的研究, E-mail 为 1314ivu@126.com。通讯作者吴铿, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠状动脉介入治疗与心肌保护, E-mail 为 wukeng1245@hotmail.com 和 zjwukeng@hotmail.com。

率的独立危险因素^[1-2]。血管钙化通常分为内膜和中膜钙化,前者常见于动脉粥样硬化^[2],后者是指钙磷沉积于血管中膜,最多见于 2 型糖尿病患者^[3-4]。传统认为钙磷沉积是被动退行性病理变化,目前大多学者认为血管钙化是被严密调控的主动过程,常伴有胚胎期骨骼发育生成的特点,也即血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 转分化为成骨样细胞^[5]。有报道指出,高糖可能会引发 VSMC 钙化,能引起内质网应激反应 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 和凋亡^[6-8];有学者认为,高糖引起血管钙化可能是血管壁细胞和细胞外基质共同作用的主动病理过程,类似于骨的发育过程^[1,5];然而,内质网应激以及凋亡是否参与高糖诱发 VSMC 钙化尚不清楚。因此,本研究采用体外高糖处理大鼠 VSMC 模拟机体糖尿病状态,试图阐述内质网应激以及凋亡在高糖所致血管钙化中的作用与机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

D-葡萄糖、Hoechst33258、衣霉素 (tunicamycin)、4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA)、茜素红购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测定试剂盒购自南京建成科技公司,DMEM 培养基购于 Hyclone 公司 (USA),胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco BRL (USA)。抗 GRP78、抗 CHOP、抗 Caspase-12、抗 Osterix、抗 Runx2、抗 GAPDH 等抗体购自 Cell Signaling Technology Inc (CST)。

1.2 细胞培养与实验分组

SD 大鼠由中山大学实验动物中心提供,分离培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞 (免疫细胞化学鉴定见图 1),培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 5% CO₂、37℃ 的温箱中培养。实验分为 6 组:①正常对照组:含 5.5 mmol/L D-glucose 的 DMEM 培养基处理;②高糖 (high glucose, HG) 损伤组:含 35 mmol/L D-glucose 的 DMEM 培养基处理;③衣霉素预处理组:含 10 μg/L 衣霉素的 5.5 mmol/L D-glucose 的 DMEM 培养基作用 VSMC;④4-PBA+高糖损伤组:500 μmol/L 4-PBA 预处理 VSMC 30 min,撤去,用 PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L D-glucose 作用;⑤4-PBA 组:含 500 μmol/L 4-PBA 作用 VSMC 30 min;⑥高糖+β-甘油磷酸 (BGP) 组:含 1 mmol/L BGP 的 35 mmol/L D-glucose 的 DMEM 培养基作用

VSMC。

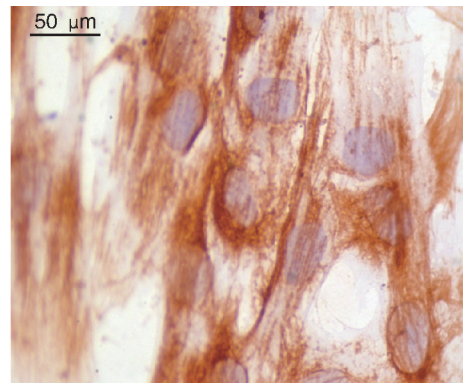


图 1. 主动脉平滑肌细胞的免疫细胞化学鉴定

Figure 1. Immunocytochemistry identification of aortic smooth muscle cells

1.3 钙含量测定

上述各实验组 VSMC 经不同的处理后,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 0.6 mol/L HCl 37℃ 脱钙 60 min,采用钙离子定量检测试剂盒 (甲基百里香酚蓝比色法) 检测上清液中钙含量,剩余的细胞用 PBS 洗 3 次,加入细胞裂解液溶解 30 min 后,使细胞充分裂解,提取胞浆蛋白,用上清液中钙含量除以细胞蛋白含量以校正,所得数据即为钙含量。

1.4 茜素红染色测定钙沉积

为测定 VSMC 钙沉积,将 VSMC 接种于 12 孔培养板中,在细胞生长到约 80% 时,上述各实验组经不同的处理后,PBS 冲洗 3 次,然后用 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定 10 min,PBS 冲洗 3 次,放入 1% 茜素红 S 溶液内染色 30 min,用 0.2% 醋酸溶液快速冲洗 1 次,滤纸吸干后系列酒精脱水,二甲苯固定和封片,显微镜下观察记录。

1.5 碱性磷酸酶活性测定

将 VSMC 接种于 12 孔培养板中,弃培养液,PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次,加 1 mL 1% Triton X 的生理盐水,4℃ 放置 24 h。超声波处理 20 s,使细胞充分裂解,在倒置显微镜下观察细胞破碎;12000 r/min 离心 10 min,取上清采用 ALP 检测试剂盒 (磷酸苯二钠法),测量 ALP 活性,提取部分细胞蛋白测定蛋白含量以校正细胞 ALP 活性。

1.6 Western blot 法测定蛋白的表达

将 VSMC 接种于 35 mm 培养皿中,生长到 80% 满时,各实验组予指定的处理因素后,使用预冷的 PBS 洗 3 次,加入裂解液后 4℃ 静置 30 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清后采用 BCA 法进行蛋白

定量。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转印迹至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭60 min,然后分别加入适当比例的相应一抗,4℃摇床过夜,TBST洗3次,每次5 min。将PVDF膜用ECL发光试剂显色,暗室曝光到X线片上,扫描Imag J分析结果,重复5次。

1.7 统计学处理

实验数据用SPSS16.0软件进行统计分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用LSD-t进行均数之间的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导 VSMC 转分化为成骨样细胞

为了探讨高糖对 VSMC 转分化为成骨样细胞的影响,以 β -甘油磷酸(BGP)处理诱导 VSMC 钙化为阳性对照组,高糖处理3天后,通过比色法测定ALP活性;高糖处理7天后,通过O-cresolphthalein法和Western blot测定钙含量和骨分化转录因子(Runx2和Osterix)。结果发现,与正常对照组比较,ALP活性增强、钙含量增加、Runx2和Osterix表达上调,内质网应激诱导剂10 $\mu\text{g/L}$ 衣霉素处理7天能上调骨分化转录因子表达(图2和图3)。上述结果提示高糖可以诱导 VSMC 转分化为成骨样细胞(也即收缩表型转化为成骨样表型)。

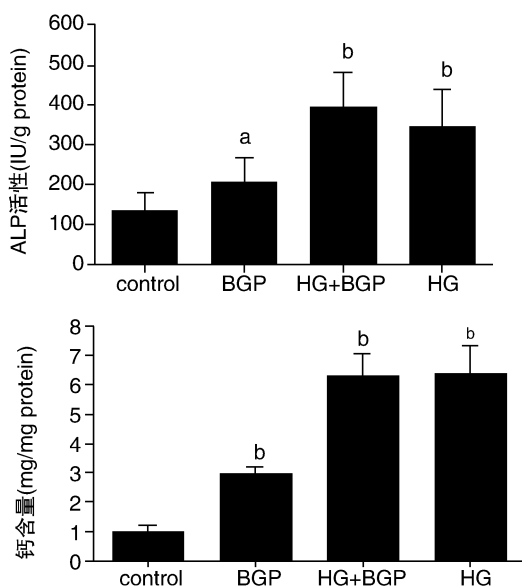


图2. 高糖诱导 VSMC 的 ALP 活性增强和钙含量增加($\bar{x} \pm s$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

Figure 2. High glucose induced ALP activity and calcium content increase of VSMC($\bar{x} \pm s$)

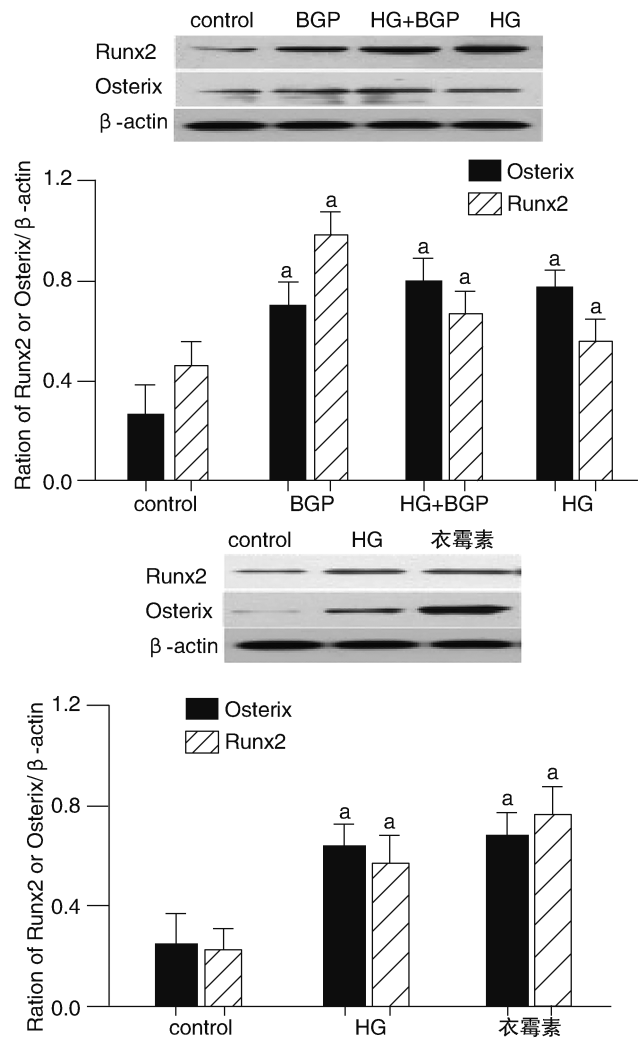


图3. 高糖诱导 VSMC 骨分化转录因子表达上调($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

Figure 3. High glucose induced osteogenic markers upregulation of VSMC($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

2.2 4-PBA 能抑制高糖诱导的内质网应激

为了明确内质网应激在高糖所致血管钙化中的作用,高糖处理细胞7天后,Western blot法测定内质网应激标志蛋白(GRP78、CHOP和Caspase-12)的表达,发现与正常对照组比较,GRP78、CHOP和Caspase-12表达显著增多(图4);接着,为了观察高糖环境下内质网应激在 VSMC 凋亡中的作用,发现采用内质网应激抑制剂500 $\mu\text{mol/L}$ 4-PBA预处理30 min明显抑制GRP78和CHOP的表达,这些结果提示内质网应激可能介导了 VSMC 钙化。

2.3 内质网应激介导了高糖引起的 VSMC 钙化

为了证实内质网应激介导了高糖引起的 VSMC 钙化,发现采用内质网应激抑制剂4-PBA预处理30 min,能明显下调高糖引起的ALP活性增强、钙含量增加(图5),同时茜素红染色结果也显示钙沉积下

降(图 5),这些结果强烈提示内质网应激和凋亡介 导了高糖引起的 VSMC 钙化(成骨样细胞转分化)。

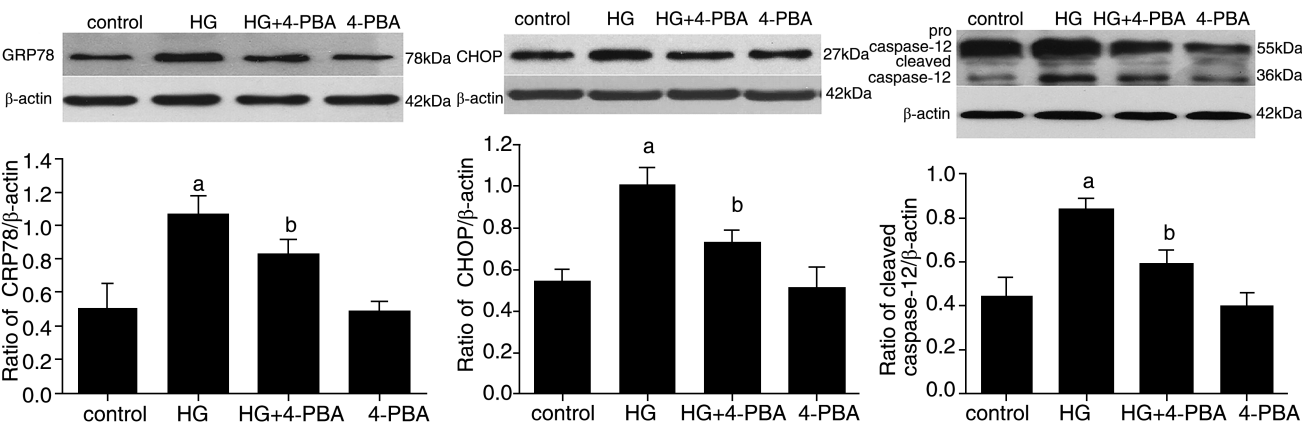


图 4. 4-PBA 能抑制高糖诱导的 VSMC 内质网应激($\bar{x}\pm s, n=5$) a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.01$,与高糖损伤组比较。
Figure 4. 4-PBA suppressed ER stress of VSMC($\bar{x}\pm s, n=5$)

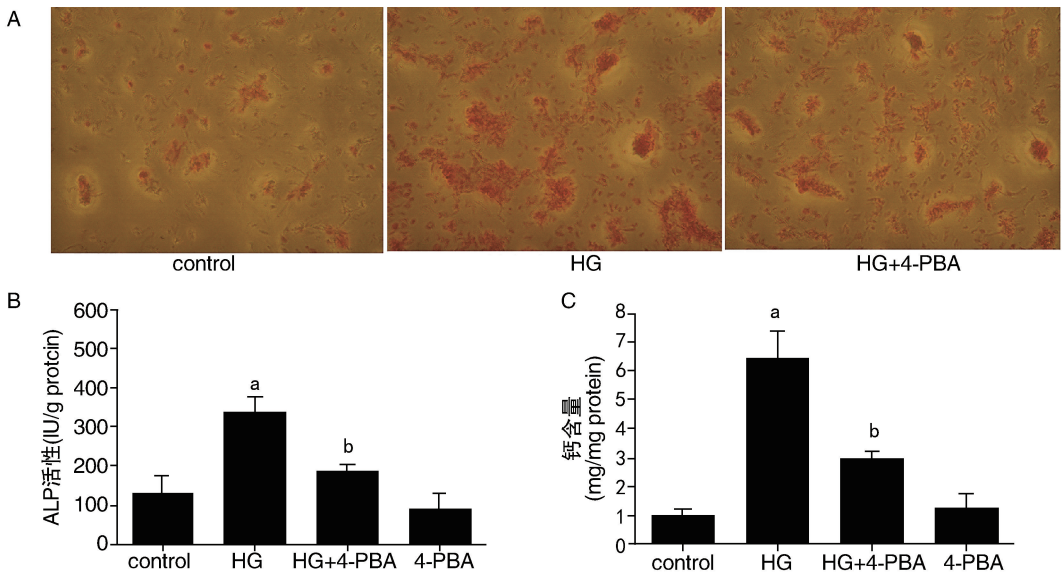


图 5. 4-PBA 能抑制高糖诱导的 VSMC 钙化($\bar{x}\pm s, n=5$) 35 mmol/L D-葡萄糖处理 VSMC 不同时间,茜素红染色观察钙沉积程度(7 天)(图 A),比色法和 O-cresolphthalein 法检测碱性磷酸酶(3 天)(图 B)和钙含量(7 天)(图 C)。a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.01$,与高糖损伤组比较。

Figure 5. 4-PBA suppressed calcification of VSMC induced by high glucose($\bar{x}\pm s, n=5$)

3 讨论

本研究结果显示:体外高糖处理(模拟机体糖尿病状态)能诱导 VSMC 内质网应激反应和凋亡增加,分子伴侣 4-PBA(内质网应激抑制剂)能阻断 VSMC 的钙化(血管硬化的重要过程),以上结果提示内质网应激可能是 VSMC 钙化的重要机制^[9-11]。值得注意的是,4-PBA 在下调内质网应激标志蛋白的同时,减少了 VSMC 凋亡,延缓了 VSMC 从 SMC 收缩表型向成骨样表型的转分化。本研究首次报

道了内质网应激介导了高糖引起的 VSMC 钙化过程。

血管硬化是糖尿病患者的常见并发症,也是心血管疾病高发病率和病死率的独立危险因素^[1],目前多数学者认为血管钙化是被调控的主动过程,常伴有胚胎期骨发育的特点^[4],即 VSMC 转分化为成骨样细胞^[5];越来越多研究发现,高糖可能会引起 VSMC 钙化,此过程是血管壁细胞尤其是 VSMC 主动参与的类似骨发育过程^[12-13]。VSMC 发生表型转化在血管钙化中发挥重要作用,VSMC 的成骨样

细胞表型一经形成,骨分化转录因子 Runx2 和 Osterix 等就会在 VSMC 表达升高,标志着血管钙化的始动环节^[12-13]。VSMC 是一种由间胚层分化发育而来的非终末分化细胞,对于血管的收缩和舒张有着十分重要的作用,外培养能引起其表型转化^[12-13]。

以往的研究表明:高糖环境能诱导体外 VSMC 钙化^[14-16]。然而,高糖诱导 VSMC 钙化的机制尚不明确,另一方面,高糖及其代谢产物葡萄糖胺可引起 VSMC 内质网应激,与动脉粥样硬化形成有关^[15-17]。内质网应激可引起未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),UPR 包括 IRE1、XBP1 和蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)途径^[15-17]。内质网应激及相关凋亡是否参与高糖诱发 VSMC 钙化鲜有报道,本研究结果和其他学者的报道显示,高糖或糖尿病环境下,VSMC 的内质网应激标志蛋白及相关凋亡蛋白表达上调(GRP78、CHOP 和 Caspase-12),4-PBA 预处理能下调它们的表达,抑制凋亡和钙化发生,表现为 Caspase-12 表达降低,ALP 活性降低、钙含量下降和钙沉积减少。以上结果提示内质网应激以及凋亡介导了高糖所致血管钙化。新近研究证实:RNAi 技术敲低 PERK 调控内质网应激通路,能抑制高糖诱导 VSMC 向成骨样细胞的转分化过程,进而干预血管钙化的发生^[11-12]。这些研究进一步验证了内质网应激介导了高糖所致血管钙化。

综上所述,高糖诱导 VSMC 转分化为成骨样细胞,表现为 VSMC 的 ALP 活性增强、钙含量增加和骨分化转录因子表达上调,高糖处理引起内质网应激、凋亡增多;另一方面,4-PBA 能抑制高糖诱导的 VSMC 内质网应激、凋亡和钙化,证实了内质网应激至少部分介导了高糖引起的 VSMC 钙化。

[参考文献]

- [1] 傅碧玲, 邹世海, 彭鑫, 等. 高磷、高钙诱导人血管平滑肌细胞钙化的研究[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(6): 603-607.
- [2] Chen NX, Duan D, O'Neill KD, et al. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells [J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(12): 3 435-442.
- [3] 袁妙兰, 段新云, 马育林. 网膜素对成骨细胞向钙化血管平滑肌细胞分化的影响及其机理[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 269-274.
- [4] 马琦, 边云飞, 白瑞, 等. 吡咯列酮通过内质网应激致凋亡途径促进大鼠血管平滑肌细胞钙化[J]. 中国医药指南, 2015, 13(7): 13-16.
- [5] Wang Y, Shan J, Yang W, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins [J]. Inflammation, 2013, 36(6): 1 592-604.
- [6] 白亚玲, 徐金升, 钱玥彤, 等. γ 干扰素对高磷诱导大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响研究[J]. 中国心血管杂志, 2015, 20(1): 62-66.
- [7] 马琦, 边云飞, 白瑞, 等. 吡咯列酮通过内质网应激致凋亡途径对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(4): 351-356.
- [8] 邵文. 血管平滑肌细胞与血管钙化机制的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(16): 2 898-901.
- [9] 宋艳. 程序性细胞死亡与血管钙化关系的研究进展[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2013, 13(4): 639-642.
- [10] 金波, 尹恒冲, 汪凌清, 等. 平滑肌细胞成骨分化致血管钙化中 MAPK 信号通路基因的表达谱变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(20): 3 618-625.
- [11] 颜建云, 周芹, 于汇民, 等. 高糖激活 WNT 信号通路促进血管平滑肌细胞钙化[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(1): 29-33.
- [12] Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, et al. High glucose concentration does not modulate the formation of arterial medial calcification in experimental uremic rats [J]. J Vasc Res, 2013, 50(6): 512-520.
- [13] 邱翠婷, 吕安林, 李寰, 等. 钙磷诱导大鼠血管平滑肌细胞钙化的机制研究[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(1): 64-67.
- [14] Zhou YB, Zhang J, Peng DQ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands retard cultured vascular smooth muscle cells calcification induced by high glucose [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 66(3): 421-429.
- [15] 陈泽君, 黄颂敏, 樊文星. 高糖刺激血管平滑肌细胞表达 cbfa-1 和 OC 的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2010, (5): 784-788.
- [16] Liu F, Zhong H, Liang JY, et al. Effect of high glucose levels on the calcification of vascular smooth muscle cells by inducing osteoblastic differentiation and intracellular calcium deposition via BMP-2/Cbfa-1 pathway [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(12): 905-911.
- [17] 陈天雷, 毛慧娟, 陈铖, 等. Klotho 蛋白对血管平滑肌细胞钙化的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(6): 434-439.

(此文编辑 许雪梅)