

Ghrelin 在糖尿病血管钙化中的作用

徐绥宁¹, 李丽华², 杜睿³, 严金川¹, 丁英鹏¹, 叶斐¹, 王中群¹

(江苏大学附属医院 1.心内科,2.病理科,3.超声科,江苏省镇江市 212001)

[关键词] 血清学; 生长激素促分泌素; 糖尿病; 血管钙化

[摘要] **目的** 观察生长激素促分泌素(Ghrelin)在糖尿病血管钙化中的作用。**方法** 选取江苏大学附属医院 30 例糖尿病足截肢患者。根据超声对下肢动脉狭窄程度的检测将患者分为轻度狭窄组(狭窄<50%)($n=10$)、中度狭窄组($50\% \leq \text{狭窄} < 70\%$)($n=10$)及重度狭窄/闭塞组($70\% \leq \text{狭窄} \leq 100\%$)($n=10$)。通过患者血清学、临床相关指标的检测以及截肢胫动脉组织连续石蜡切片 HE 染色、Von kossa 钙染色、血管钙含量、碱性磷酸酶(ALP)活性检测及 Western blot 检测观察钙化。**结果** 糖尿病截肢患者胫动脉超声、HE 染色及 Von Kossa 染色一致显示:三组患者胫动脉中膜均有弥散的黑色钙盐;但相对于轻度狭窄和中度狭窄组,重度狭窄/闭塞组胫动脉粥样硬化斑块内可见大量点灶状的黑色钙盐沉积(超声为强回声的硬斑块)。定量检测显示重度狭窄组/闭塞组胫动脉 ALP 活性及钙含量增加显著,分别是轻度狭窄组的 2.44 倍和 2.39 倍,但中度狭窄组与轻度狭窄组相比,无统计学差异。Western blot 检测显示随着血管狭窄程度加重,病变组织 Ghrelin、骨保护素(OPG)表达下调,细胞核因子受体活化因子配体(RANKL)表达上调。Pearson 相关性分析显示糖尿病截肢患者血清 Ghrelin 可能与胫动脉钙含量呈负相关($r=-0.64, P<0.001$)、与 OPG 呈正相关($r=0.85, P<0.001$),与 sRANKL 呈负相关($r=-0.85, P<0.001$)。结论 随着糖尿病患者血管钙化程度的加重,Ghrelin 与 OPG 表达下调,而 RANKL 的表达上调,提示血清 Ghrelin、OPG/RANKL 水平对糖尿病患者不同级别血管钙化可能有一定预警价值。

[中图分类号] R329-33

[文献标识码] A

Role of Ghrelin in Diabetic Vascular Calcification

XU Sui-Ning¹, LI Li-Hua², DU Rui³, YAN Jin-Chuan¹, DING Ying-Peng¹, YE Fei¹, and WANG Zhong-Qun¹

(1.Department of Cardiology, 2.Department of Pathology, 3.Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Serology; Ghrelin; Diabetes; Vascular Calcification

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of Ghrelin in diabetic vascular calcification. **Methods** Thirty cases of diabetic foot amputation patients from the Affiliated Hospital of Jiangsu University were enrolled. The tibial artery stenosis of patients were divided into three groups according to Doppler ultrasound: mild stenosis group (stenosis<50%)($n=10$), moderate stenosis ($50\% \leq \text{stenosis} < 70\%$)($n=10$) and severe stenosis / occlusion group ($70\% \leq \text{stenosis} \leq 100\%$)($n=10$). Serum and clinical related indicators detection, HE staining, Von Kossa calcium staining, vascular calcium content, alkaline phosphatase(ALP) activity assay and Western blot assay were performed. **Results** Consistent with ultrasound results of diabetic amputee tibial artery, HE staining and Von Kossa staining showed: there were a lot of diffuse black membrane calcium in the tibial arteries of three groups; but compared with mild stenosis group and moderate stenosis group, there were a lot of spotty black calcium deposition (hard hyperechoic plaque in ultrasound) in the tibial artery atherosclerotic plaques of severe stenosis / occlusion group. Quantitative tests showed the ALP activity and calcium content of tibial artery increased significantly in severe stenosis group, they were 2.44 times and 2.39 times for mild stenosis group

[收稿日期] 2015-10-09

[修回日期] 2016-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81370408,81370409);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(SH2015038,SH2015023);卫生部核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室开放课题(KF201504)

[作者简介] 徐绥宁,硕士研究生,研究方向为糖尿病合并动脉粥样硬化,E-mail 为 amyxs@outlook.com。李丽华,硕士,主治医师,从事动脉粥样硬化的分子病理研究。通讯作者王中群,博士,主治医师,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。

respectively, but compared with mild stenosis group, there was no statistically significant difference in the moderate stenosis group. Western blot assay showed the expression of osteoprotegerin (OPG) were reduced, while the expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) was up-regulated. According to Pearson correlation analysis we observed a negative correlation between tibial artery calcium content and Ghrelin ($r = -0.64, P < 0.001$) as well as between Ghrelin and sRANKL ($r = -0.85, P < 0.001$), while OPG was positively correlated with Ghrelin ($r = 0.85, P < 0.001$).

Conclusion With the extent of vascular calcification in diabetic patients worsening, the expression of Ghrelin and OPG were down-regulated, while the expression of RANKL was up-regulated, suggesting serum Ghrelin, OPG/sRANKL levels may have an early-warning value.

近年来全球糖尿病患病率增长迅猛。糖尿病患者存在广泛血管钙化,主要发生在冠状动脉和下肢血管,是导致心血管事件高发病率和死亡率的主要原因^[1],而糖尿病血管钙化严重程度和部位也是预测糖尿病患者急性心血管事件、脑卒中和截肢发生风险的最佳指标^[2]。因此积极研究血管钙化的发生机制,对预防糖尿病患者心脑血管事件及下肢截肢具有重要的理论价值及社会意义。已有的研究认为血管钙化发生的关键在于血管壁矿化防御机制被耗竭,血管平滑肌细胞(VSMC)丢失原有表型而获得成骨表型,但确切机制尚未清楚^[3-4]。生长激素促分泌素(Ghrelin)在心血管系统中发挥舒张血管、增强心肌收缩力、保护心血管系统等生物学作用^[5]。最近的研究显示 Ghrelin 可以调节成骨细胞的增殖和分化,也可以通过影响 VSMC 的增殖、凋亡来抑制 VSMC 向成骨细胞分化,从而抑制血管钙化^[6],具体机制尚不清楚。已知骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/细胞核因子受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)是在骨重建中起关键调控作用的细胞因子,近年来逐渐成为血管钙化的研究热点。已有研究发现血清 OPG 水平与冠状动脉钙化积分呈正相关,RANKL 水平与冠状动脉钙化积分呈负相关,血清 OPG 水平及 OPG/RANKL 比值可用于预测冠状动脉钙化严重程度^[7]。但在糖尿病患者血管钙化中 Ghrelin 与 OPG/RANKL 系统的关系究竟如何,现有的研究尚不能给出一个清晰的答案。为此,本研究旨在从人体层面观察 Ghrelin 在糖尿病血管钙化中的作用以及 Ghrelin 是否通过 OPG/RANKL 信号介导调控糖尿病血管钙化的形成及发展,以期对糖尿病血管钙化的防治策略带来新的视角。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 6 月至 2015 年 6 月在江苏大学附

属医院骨科住院因糖尿病足行股骨中下 1/3 截肢治疗的患者共 30 例,均因足部已出现坏疽或下肢、足部已出现严重感染,无法进行血运重建行截肢术。根据下肢胫前动脉彩色多普勒检查结果将患者分为 3 组:轻度狭窄组(狭窄 < 50%)、中度狭窄组(50% ≤ 狭窄 < 70%)、重度狭窄及闭塞组(70% ≤ 狭窄 ≤ 100%)。所有手术均经江苏大学附属医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书及手术同意书,医务科备案。

1.2 超声检测

采用 PHILIPS HDII 彩色多普勒诊断仪,探头频率 7~12 Hz,受检者取平卧位及俯卧位,充分暴露双侧下肢,重点观察双侧股动脉、腘动脉、胫前动脉和足背动脉,观察内膜中膜厚度(IMT, IMT > 0.15 cm 视为粥样斑块形成)、粥样斑块大小、有无管腔狭窄、血流充盈缺损状况,并用脉冲多普勒频谱流速测定分析下肢动脉狭窄程度。

1.3 HE 染色及 Von Kossa 染色

取各组截肢患者胫前动脉,10%中性甲醛固定,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。Von Kossa 染色:取胫前动脉石蜡切片,脱蜡脱水后按试剂盒操作说明置于 2%硝酸银溶液中,强阳光线下直射 40 min 后用蒸馏水冲洗 3 遍,吸净蒸馏水后用 5%硫代硫酸钠溶液定影处理 2 min,再次用蒸馏水冲洗 3 min,中性品红复染 3 min,经脱水、透明、封片后,于光镜下观察主动脉钙盐沉积情况。

1.4 组织钙含量测定及组织碱性磷酸酶活性测定

取动脉组织(约 10 mg)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-酚肽络合酮法测定。脱钙后的组织洗涤后,以 BCA 法测定蛋白含量,并以蛋白含量标化钙化量。

组织碱性磷酸酶(ALP)活性测定:组织剪碎匀浆,按照试剂盒说明,依次加入 0.1 g/L 酚标准液、待测样本、缓冲液、基质液等,充分混匀 37℃水浴 30 min,加入显色液,比色法测定 520 nm 下的吸收值。

ALP 活性用每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位计算并以蛋白含量标准化。

1.5 Western blot 检测

提取胫前动脉组织总蛋白,BCA 蛋白定量并煮沸变性,8%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后,电转移(100 mA 2 h)至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶 4℃ 摇床摇育过夜后,按比例加入一抗(OPG 1:500,RANKL 1:500,苏州睿瀛生物技术有限公司),于 4℃ 孵育 12 h;TBST 洗涤 3 次,每 5 min 换液 1 次;按 1:1000 比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1.5 h;TBST 洗 3 次,每 5 min 换液 1 次;用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,蛋白条带采用 UVP 凝胶图像分析系统分析,以各组目的蛋白与内参蛋白吸光度值的比值来比较待测蛋白的表达差异。

1.6 ELISA 检测

所有受检者禁食过夜后于早晨 8:00 采集静脉血,分离血清并-70℃ 超低温冰箱保存直至研究当天,所有项目同一天检测。血清样本中 Ghrelin、

OPG,sRANKL 水平按照 ELISA 试剂盒的具体步骤进行操作(南京建成生物公司)。

1.7 统计学方法

所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验,所有数据用 SPSS11.0 软件分析,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,相关分析采用 Pearson 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病足截肢患者胫动脉内膜钙化的演进

超声多普勒显示,重度狭窄/闭塞组胫动脉粥样硬化斑块以强回声的硬斑块为主,而轻度狭窄与中度狭窄组患者斑块则以混合斑块为主(图 1)。胫动脉 HE 及 Von Kossa 染色(图 1)显示,随着动脉壁粥样硬化斑块不断增大乃至管腔闭塞,脂质池中针菱形的胆固醇结晶、粉染的无定形物质及黑染的点灶状钙颗粒沉积不断增多,内弹力板完整性被破坏。

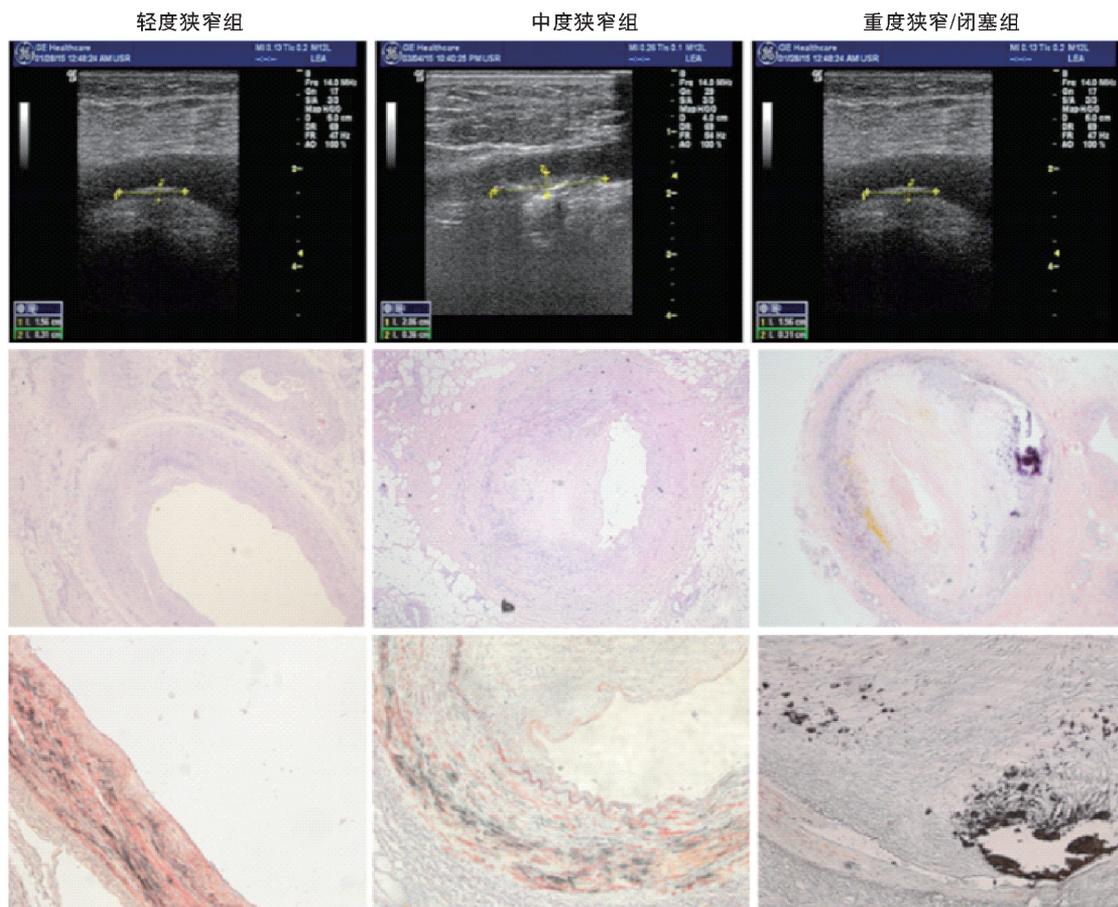


图 1. 糖尿病足截肢患者胫动脉内膜钙化的演进过程 上图为超声检查,中图为 HE 染色(40×),下图为 Von Kossa 染色(100×);图中黄色箭头为斑块,黑染颗粒为钙盐沉积。

Figure 1. Progression of tibial artery intimal calcification

2.2 糖尿病足截肢患者胫动脉钙化相关指标的动态变化

邻甲-酚酞络合酮法钙定量检测显示,重度狭窄/闭塞组胫动脉钙盐含量是轻度狭窄组的 2.39 倍 ($P<0.001$),中度狭窄组比轻度狭窄组钙盐含量有增加,但差异无显著性 ($P>0.05$;表 1)。

胫动脉 ALP 活性检测显示,重度狭窄/闭塞组 ALP 活性是轻度狭窄组的 2.44 倍 ($P<0.001$),不过,中度狭窄组与轻度狭窄组 ALP 活性差异无显著性 ($P>0.05$;表 1)。这与钙盐沉积的变化相一致。

表 1. 胫动脉钙含量及碱性磷酸酶活性($\bar{x}\pm s$)

Table 1. Calcium content and ALP activity in tibial artery ($\bar{x}\pm s$)

分 组	钙含量 (mmol/g)	ALP 活性 (kU/g)
轻度狭窄组	2.89±0.78	215.60±23.42
中度狭窄组	3.36±0.99	235.60±31.59
重度狭窄/闭塞组	6.92±1.29 ^a	526.90±47.61 ^a

a 为 $P<0.001$,与轻度狭窄组比较。

2.3 糖尿病足截肢患者胫动脉钙化相关蛋白的表达变化

Western blot 分析显示,随着血管狭窄程度加重,胫动脉 Ghrelin、OPG 表达呈现下降趋势,而 RANKL 表达则呈上调趋势(图 2)。

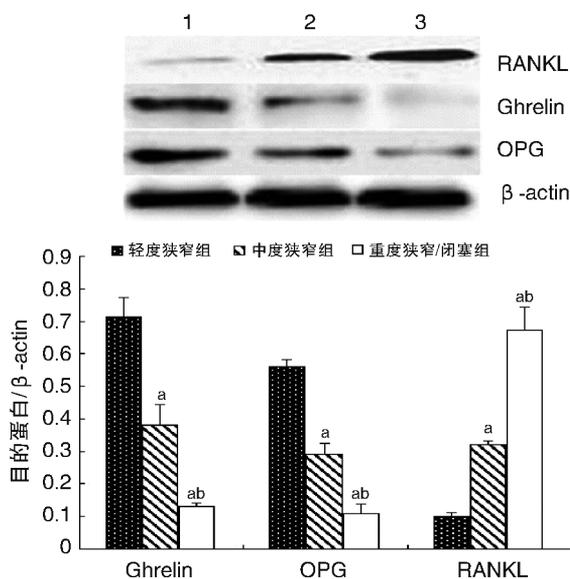


图 2. Western blot 检测胫动脉 Ghrelin、OPG 及 RANKL 的蛋白表达 1 为轻度狭窄组,2 为中度狭窄组,3 为重度狭窄/闭塞组。a 为 $P<0.05$,与轻度狭窄组比较;b 为 $P<0.05$,与中度狭窄组比较。

Figure 2. Protein expression of Ghrelin, OPG and RANKL in tibial artery by Western blot

2.4 糖尿病足截肢患者血清学相关指标的变化及相关性分析

血清学分析显示,随着血管狭窄程度加重,血清学 Ghrelin 和 OPG 含量显著下降,而 sRANKL 含量显著升高,重度狭窄/闭塞组、中度狭窄组及轻度狭窄组组间均具有统计学差异 ($P<0.05$;表 2)。相关性分析显示,血清 Ghrelin 与胫动脉钙含量呈负相关 ($r=-0.64, P<0.001$),与 OPG 呈正相关 ($r=0.85, P<0.001$),与 sRANKL 呈负相关 ($r=-0.85, P<0.001$)(图 3)。

表 2. 糖尿病患者血清学 Ghrelin、OPG 及 sRANKL 水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2. Serum levels of Ghrelin, OPG and sRANKL of patients with diabetes ($\bar{x}\pm s$)

指 标	轻度狭窄组 (n=10)	中度狭窄组 (n=10)	重度狭窄/闭塞组 (n=10)
Ghrelin (μg/L)	173.2±17.36	107.61±10.78 ^a	42.91±6.01 ^{ab}
OPG (ng/L)	25.44±2.73	17.36±2.14 ^a	7.94±1.26 ^{ab}
sRANKL (μg/L)	0.93±0.34	2.76±0.45 ^a	4.16±0.53 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与轻度狭窄组比较;b 为 $P<0.05$,与中度狭窄组比较。

3 讨 论

目前糖尿病及其并发症是导致心血管疾病高死亡率的首要原因,而血管钙化是能增加糖尿病患者发病率和死亡率的一种常见的病理过程^[8]。大样本多中心流行病学调查证实中国人群血管钙化的患病率高达 59.2%,钙化积分>300 的人群发生急性心肌梗死、心源性猝死等急性心血管事件的风险远高于钙化积分 1~100 的人群^[9-10]。血管钙化形成的过程是一种类似于骨矿化的生物学过程,其中中心环节是血管平滑肌细胞向成骨样细胞分化,但机制一直未明。而 OPG/RANKL 系统主要调节破骨细胞与成骨细胞重建,所以与血管钙化形成和发展密切联系。Ghrelin 是由 28 个氨基酸组成的肽类激素,存在有活性的酰基化 Ghrelin 和没活性但分布更广泛的去酰基化 Ghrelin,有研究表明 Ghrelin 在调节糖代谢中的作用是通过促进胰岛 β 细胞分泌来影响胰岛素的敏感性^[11],因此可能在糖尿病血管钙化发生中有一定作用。

本研究描述了 Ghrelin 在糖尿病截肢患者不同级别血管钙化中的改变及其与 OPG、RANKL 的可能关系。根据胫动脉超声血管狭窄程度,本研究分为轻度狭窄组(狭窄<50%)、中度狭窄组(50%≤狭

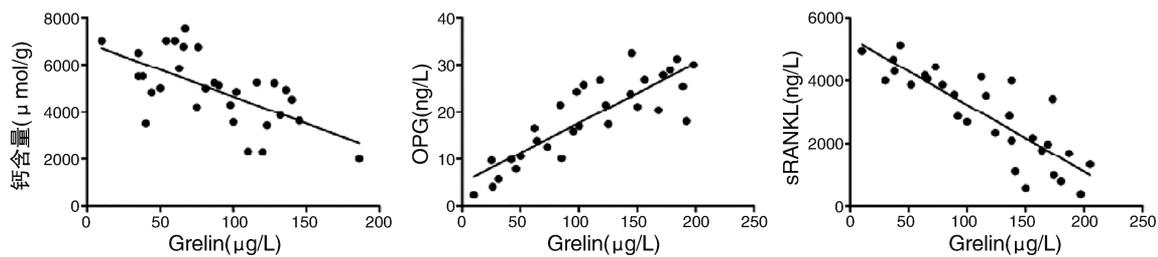


图 3. 血清 Ghrelin 与胫动脉钙含量、血清 OPG、血清 sRANKL 的相关性分析

Figure 3. The correlation of serum Ghrelin levels with arterial calcium content, serum OPG and sRANKL

窄 < 70%) 及重度狭窄/闭塞组 (70% ≤ 狭窄 ≤ 100%), 形态学证实, 随着血管狭窄程度加重, 糖尿病患者血管内膜逐渐增厚, 动脉粥样硬化斑块不断增大, 黑色颗粒的钙盐沉积也增多, 提示钙化不断加重。通过钙化的相关指标钙含量与 ALP 活性检测, 同样显示随着血管狭窄程度加重, 钙含量和 ALP 呈现增加趋势。Western blot 分析显示随着血管狭窄程度加重, 胫动脉 Ghrelin、OPG 表达下调, 而 RANKL 表达则上调。已知 OPG 与 RANKL 之间的平衡对于调节破骨细胞形成及钙化至关重要^[12-13], 成骨细胞及骨髓基质细胞表达 RANKL, 与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的 RANK 结合后, 直接诱导破骨细胞的分化, 增强成熟破骨细胞的活性, 并抑制破骨细胞的凋亡, 从而促进钙化, 而成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达的 OPG 通过与 RANKL 竞争性结合, 阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合, 从而可能通过抑制破骨细胞的生成, 抑制血管钙化。与此相一致, 我们的研究显示随着钙化程度加重, OPG 表达减少, RANKL 表达增加, Ghrelin 表达下调, 那么 Ghrelin 与 OPG/RANKL 系统间有否一定的关联?

我们后续研究显示糖尿病患者血清 Ghrelin 与胫动脉钙含量呈负相关, 提示 Ghrelin 可能有抑制钙化的作用, 而且有研究显示酰基化 Ghrelin 可通过生长激素促分泌素受体 GHSR-1a 促进成骨细胞的增殖与分化^[14], 在 GHSR-1a 缺失时酰基化 Ghrelin 和去酰基化 Ghrelin 可以通过刺激促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)/磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) 途径促进成骨细胞增殖^[15]。另外, 相关性研究显示血清 Ghrelin 与 OPG 呈正相关, 与 sRANKL 呈负相关, 进而推测 Ghrelin 可能通过协同 OPG 或者拮抗 RANKL 来参与糖尿病患者血管钙化的形成与发展, 但是由于我们的临床样本资料有限, 相关性研究结果有待进一步研究, 具体机制需要从动物水平和细胞水平上做进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Heath JM, Sun Y, Yuan K, et al. Activation of AKT by O-linked N-acetylglucosamine induces vascular calcification in diabetes mellitus[J]. *Circ Res*, 2014, 114(7): 1094-102.
- [2] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(23): 1515-525.
- [3] Deng L, Huang L, Sun Y, et al. Inhibition of FOXO1/3 promotes vascular calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 175-183.
- [4] 马文琦, 刘乃丰. 糖尿病与血管钙化的基础与临床[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 453-457.
- [5] Shirai M, Joe N, Tsuchimochi H, et al. Ghrelin suppresses sympathetic hyperexcitation in acute heart failure in male rats: assessing centrally and peripherally mediated pathways[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(9): 3309-316.
- [6] Khatib MN, Simkhada P, Gode D. Cardioprotective effects of ghrelin in heart failure: from gut to heart[J]. *Heart Views*, 2014, 15(3): 74-76.
- [7] Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, et al. Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 97-104.
- [8] Sinha A, Vyavahare NR. High-glucose levels and elastin degradation products accelerate osteogenesis in vascular smooth muscle cells [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2013, 10(5): 410-419.
- [9] Bild DE, Detrano R, Peterson D, et al. Ethnic differences in coronary calcification: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [J]. *Circulation*, 2005, 111(10): 1313-320.
- [10] Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(13): 1336-345.
- [11] Granata R, Settanni F, Julien M, et al. Des-acyl ghrelin fragments and analogues promote survival of pancreatic beta-cells and human pancreatic islets and prevent diabetes in streptozotocin-treated rats [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(6): 2585-596.
- [12] Ndip A, Williams A, Jude EB, et al. The RANKL/RANK/OPG signaling pathway mediates medial arterial calcification in diabetic Charcot neuroarthropathy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(8): 2187-196.
- [13] Yuan LQ, Zhu JH, Wang HW, et al. RANKL is a downstream mediator for insulin-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29037.
- [14] Mrak E, Casati L, Pagani F, et al. Ghrelin increases beta-catenin level through protein kinase A activation and regulates OPG expression in rat primary osteoblasts [J]. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015: 547473.
- [15] Kim SW, Her SJ, Park SJ, et al. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Bone*, 2005, 37(3): 359-369.

(此文编辑 许雪梅)