

蛋白激酶 C 活性与糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化积分的相关性

李丽华¹, 叶斐², 付先利¹, 吴建农¹, 严金川², 邵晨², 王中群²

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

[关键词] 糖尿病足; 动脉粥样硬化; 血管钙化; 蛋白激酶 C

[摘要] **目的** 探讨蛋白激酶 C(PKC)活性与糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化之间的相关性。**方法** 选取 2012 年 10 月至 2016 年 1 月在江苏大学附属医院骨科行糖尿病足大截肢住院治疗的患者共 60 例,根据 CT 对胫前动脉钙化程度的检测将患者分为轻度钙化组($n=20$)、中度钙化组($n=20$)及重度钙化组($n=20$)。通过患者临床基线资料的采集以及胫前动脉组织连续石蜡切片 Von Kossa 染色观察钙化演进,通过 PepTag[®] Assay 法检测组织细胞膜 PKC 活性,通过 Western blot 检测对 PKC α 亚型进行半定量分析。**结果** 糖尿病足截肢患者胫前动脉 Von Kossa 染色与相应的动脉 CT 扫描结果一致;胫前动脉斑块内的钙盐沉积呈点灶状分布,而且随着胫前动脉内斑块的不断扩大乃至管腔闭塞,钙颗粒的密度也有不同程度的增加,但始终呈点灶状分布的微钙化。定量检测及 Pearson 相关性分析显示 PKC 活性与糖尿病足胫前动脉钙化积分正相关($r=0.931, P<0.001$),进一步分析显示可能是 PKC α 亚型发挥了促进钙化演进的作用。**结论** PKC α 亚型的活化可能与糖尿病动脉斑块内钙化的演进存在正相关,其水平可能对针对性干预血管钙化有着一定的价值。

[中图分类号] R329-33

[文献标识码] A

Correlation between protein kinase C activity and anterior tibial artery calcification score in patients with diabetic foot amputation

LI Li-Hua¹, YE Fei², FU Xian-Li¹, WU Jian-Nong¹, YAN Jin-Chuan², SHAO Chen², WANG Zhong-Qun²

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

[KEY WORDS] Diabetic foot; Atherosclerosis; Vascular calcification; Protein kinase C

[ABSTRACT] **Aim** To observe the relationship between protein kinase C (PKC) activity and anterior tibial artery calcification score in patients with diabetic foot. **Methods** 60 diabetic patients hospitalized for above-knee amputation in the Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangsu University were recruited from October 2012 to January 2016. The patients were categorized based on the severity of anterior tibial artery calcification, which was assessed by computed tomography (CT), into mild calcification group ($0<\text{calcification score}<100, n=20$), moderate stenosis group ($100\leq\text{calcification score}<200, n=20$) and severe calcification group ($\text{calcification score}\geq 200, n=20$). Baseline clinical data regarding sex, age, duration of diabetes mellitus, hypertension status, fasting plasma glucose (FPG), glycated hemoglobin (HbA1c), and lipid profile were collected before the amputation. Von kossa staining, PepTag[®] Assay and Western blot were then performed. **Results** Similarly with Von Kossa staining, CT scan results showed that calcium deposition in anterior tibial artery plaques of diabetic patients hospitalized for above-knee amputation were enlarged and calcium particles density in moderate and severe groups were stronger than that in mild group. The calcification in all calcification groups were showed as spotty calcification. PepTag[®] Assay, Western blot and Pearson correlation showed that ante-

[收稿日期] 2016-10-27

[修回日期] 2016-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81370408、81370409);江苏省自然科学基金项目(BK20131246);江苏省卫生厅项目(Q201308);镇江市社会发展项目(SH2015038、SH2015023、SHW2015001);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);江苏大学临床专项项目(JDLZX001)

[作者简介] 李丽华,医学硕士,主治医师,主要从事动脉粥样硬化的分子病理研究。通讯作者王中群,医学博士,副研究员,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。

rior tibial artery calcification score in diabetic patients hospitalized for above-knee amputation was positively associated with PKC activity ($r=0.931$, $P<0.001$). Further analysis indicated that alpha subtypes of PKC maybe played an important role to promote the evolution of calcification. **Conclusion** The activation of PKC subtypes may be related with the evolution of calcification in atherosclerotic plaques, so as to further target the mechanism of vascular calcification.

近年来全球范围内糖尿病患者人数众多,且呈迅猛增长。截止 2010 年,我国糖尿病患者约有 9240 万,是十大死亡原因之一^[1-2]。作为糖尿病的最主要类型—2 型糖尿病,其患者血管结缔组织广泛增生,动脉粥样斑块内膜及中膜钙盐沉积,称为血管钙化。有研究认为血管钙化是心脑血管疾病死亡的独立危险因素之一,并可作为未来发生冠心病、中风及下肢截肢的预测因子^[1]。尽管并发血管钙化的糖尿病患者人数众多,社会医疗负担较重,且越来越多的研究证据表明血管钙化是细胞介导的类似胚胎骨形成和重塑的主动过程,但目前对 2 型糖尿病患者发生骨分化及血管钙化的机制知之甚少^[3]。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 作为丝氨酸-苏氨酸激酶家族的成员之一,在心脑血管系统中主要参与心肌肥大、缺血再灌注及血管收缩等生理作用。有研究表明 PKC α 作为骨基质蛋白,其通过抑制成骨细胞分化及促进成骨细胞增殖以调控成骨细胞功能,从而促进血管钙化,但 PKC 是否参与糖尿病介导的血管钙化,现有研究尚不能明确^[4]。为此,本研究旨在从人体层面观察 PKC 在糖尿病血管钙化中的作用及其是否与胫前动脉钙化积分存在相关性,希冀为糖尿病血管钙化的防治带来新思路。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 10 月至 2016 年 1 月在江苏大学附属医院骨科行糖尿病足大截肢住院治疗的患者共 60 例。所有入选患者在经强化胰岛素及规范药物治疗后仍出现下肢、足部严重感染或足部坏疽,无法血运重建而进行截肢术。术前根据下肢胫前动脉 CT 行钙化积分,并将截肢患者分为轻度钙化组(0 分<钙化积分<100 分, $n=20$)、中度钙化组(100 分 \leq 钙化积分<200 分, $n=20$)、重度钙化组(钙化积分 ≥ 200 分, $n=20$)。相关研究均经江苏大学附属医院伦理委员会批准,签署知情同意书和手术同意书。

1.2 胫前动脉钙化的 CT 监测

采用德国西门子公司 64 排多层螺旋 CT 以 3 mm/100 ms 薄层扫描整个胫前动脉。相关数据传入西门子工作站,重建层厚为 1 mm。采用 Agatston calcium score 评分系统对胫前动脉的钙化进行定量分析:将病灶 CT 值 ≥ 130 HU,钙化面积 ≥ 1.0 mm² 定义为钙化灶,钙化积分=钙化灶 CT 值记分 \times 钙化灶面积。CT 值记分规定:130~199 HU 为 1, 200~299 HU 为 2, 300~399 HU 为 3, ≥ 400 HU 为 4。对获得的图像逐层观察,圈出符合上述条件的病灶,由软件计算出总钙化积分。

1.3 Von Kossa 染色

分离截肢患者胫前动脉,固定、常规脱腊、梯度脱水后按 Von Kossa 钙染色试剂盒(南京建成生物工程研究所)操作。石蜡切片置于 2% 硝酸银溶液中,强阳光下直射 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,经梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后,于光镜下观察胫前动脉钙盐沉积及分布情况。

1.4 PepTag[®] Assay 法检测胫前动脉 PKC 活性

分离胫前动脉,提取组织的胞膜蛋白,BCA 蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行定量检测。取 9 μ L 未变性胞膜蛋白的粗提液加入到 16 μ L PKC 活性检测反应液中(经过 30 $^{\circ}$ C 2 min 处理),混匀后构成 25 μ L 反应体系。30 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。取 5 μ L 反应终产物经 0.8% 琼脂糖凝胶于 100 V 的电压条件下水平电泳 15 min,终止电泳后 UVP 凝胶电泳分析系统摄像,显示胞膜 PKC 的磷酸化与非磷酸化条带,切下凝胶磷酸化条带 250 μ L 放入 1.5 mL 刻度离心管, 95 $^{\circ}$ C 加热至凝胶溶解。将 175 μ L 热琼脂糖倒入含有 75 μ L Gel Solubilization Solution (试剂盒部分)、100 μ L 冰乙酸和 150 μ L 去离子水的试管中,摇匀后将 500 μ L 溶液倒入 0.5 mL 的比色杯中,可见/紫外分光光度计读取 570 nm 的吸光度值,以液化的不含 PepTag[®] Peptide 的琼脂糖作为空白值。根据试剂盒提供的数据和 Beer's 定律逐步计算酶活性。

1.5 Western blot 检测

提取胫前动脉组织细胞膜蛋白,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 1 : 500 加入 PKC α 一抗(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 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照蛋白吸光度值的比值来比较待测蛋白的表达差异。

1.6 统计学分析

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,三组间比较采用 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 糖尿病足截肢患者基线资料

60 例糖尿病足截肢患者年龄为 69 ± 6 岁,男女性别比例为 4.1 : 1,糖尿病病程为 11.5 ± 3.0 年;相关指标包括年龄、性别比、病程及治疗方案等在轻度钙化组、中度钙化组与重度钙化组组间没有显著性差异。

2.2 糖尿病足截肢患者胫前动脉 Von Kossa 染色情况

糖尿病足截肢患者胫前动脉 Von Kossa 染色可见,胫前动脉粥样硬化斑块内黑染的点灶状钙化分布在斑块内针菱形胆固醇结晶和粉染的坏死物质周边,三组间钙沉积对比显著。CT 扫描钙化积分定量分析显示,相对于轻度钙化组,中度钙化组和重度钙化组胫前动脉钙化积分分别增加了 2.45 倍和 4.37 倍(图 1)。

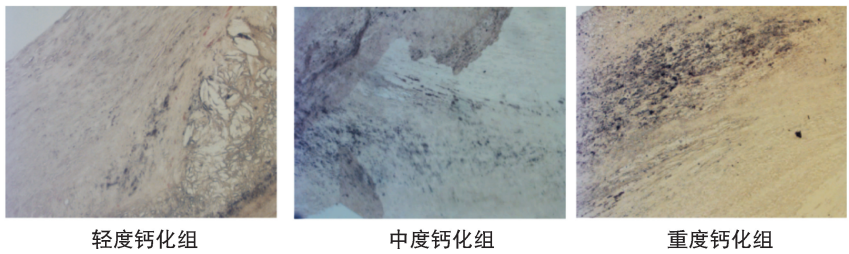


图 1. Von Kossa 染色观察糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化(200 \times)
Figure 1. Von Kossa staining was used to observe anterior tibial artery calcification in patients with diabetic foot amputation(200 \times)

2.3 糖尿病足截肢患者胫前动脉 PKC 活性与钙化积分的相关性

PepTag[®] Assay 法分析显示,相对于轻度钙化组,中度钙化组和重度钙化组胫前动脉 PKC 活性分

别增加了 2.92 倍和 5.48 倍,三组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示,胫前动脉 PKC 活性与胫前动脉钙化积分呈正相关($r=0.931, P<0.001$;图 2 和表 1)。

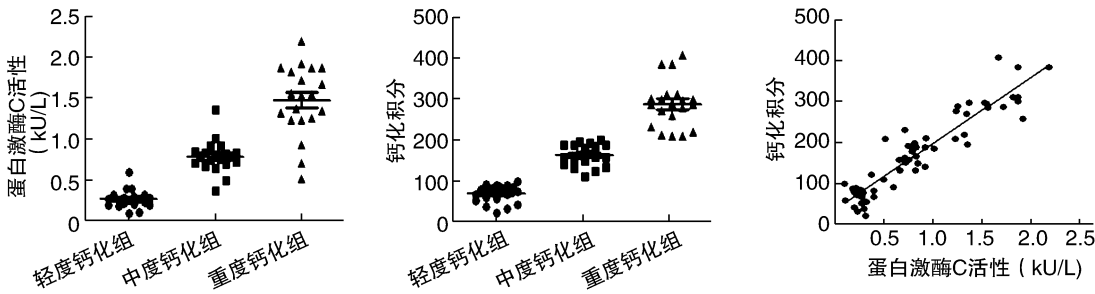


图 2. 糖尿病足截肢患者胫前动脉 PKC 活性与钙化积分的相关性分析
Figure 2. Correlation analysis of PKC activity and calcification score of anterior tibial artery in patients with diabetic foot amputation

2.4 糖尿病足截肢患者胫前动脉 PKC α 的表达

Western blot 检测显示,随着钙化的加重,胫前动脉壁细胞膜上的 PKC α 显著增加,轻度钙化组、中

度钙化组、重度钙化组的相对吸光度值分别为 0.091 ± 0.008 、 0.278 ± 0.032 、 0.512 ± 0.130 ,组间比较差异显著($P<0.05$;图 3)。

表 1. 糖尿病足截肢患者胫前动脉 PKC 活性与钙化积分($\bar{x}\pm s$)
Table 1. PKC activity and calcification score of anterior tibial artery in patients with diabetic foot amputation($\bar{x}\pm s$)

指标	轻度钙化组	中度钙化组	重度钙化组
钙化积分	65.8±22.1	161.5±26.5 ^a	287.7±57.9 ^{ab}
PKC 活性(kU/L)	0.269±0.880	0.786±0.195 ^a	1.475±0.425 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与轻度钙化组比较; b 为 $P<0.05$, 与中度钙化组比较。

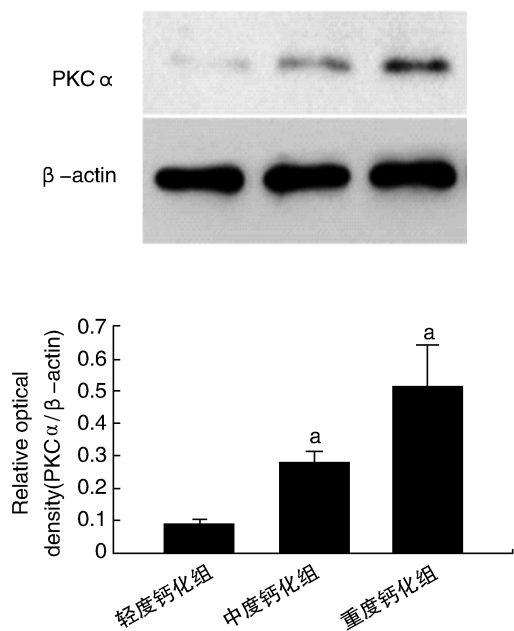


图 3. 糖尿病足截肢患者胫前动脉 PKCα 的表达 a 为 $P<0.05$, 与轻度钙化组比较。

Figure 3. The expression of PKCα in anterior tibial artery of patients with diabetic foot amputation

3 讨论

最近十年我国糖尿病发病率增长迅猛,已成为世界第一高发国^[2]。在糖尿病致死致残的重要并发症中,动脉粥样硬化以其发生早、进展快、预后差而日趋进入广大学者的研究视野^[5-6]。作为动脉粥样硬化晚期重要的并发症之一,血管钙化在预测心脑血管疾病发病率及死亡率方面作用显著,尤其是“点灶状微钙化”形成是诱发易损斑块破裂并导致一系列急性心脑血管事件的关键因素^[7-9],但迄今为止血管钙化的分子基础尚不明确。PKC 是由一条单肽链组成多功能丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,作为骨基质蛋白成员之一,其在心血管领域中各亚型的作用尚未完全阐明,通常认为 PKCα 及 PKCβ 通过抑制心脏收缩而引发心衰,而 PKCδ 和 PKCε 主要

影响心肌肥大及缺血再灌注,PKCα 及 PKCδ 参与细胞骨架改变及高磷诱导而调控血管钙化^[10]。

本研究探讨了 PKC 在糖尿病足截肢患者胫前动脉不同钙化程度中的改变及其可能关系。根据 CT 评估胫前动脉钙化程度将患者分为轻度钙化组(0 分<钙化积分<100 分)、中度钙化组(100 分≤钙化积分<200 分)、重度钙化组(钙化积分≥200 分)。形态学检测显示随着胫前动脉内斑块的不不断扩大乃至管腔闭塞,胫前动脉斑块内钙颗粒密度不断增加,提示钙化不断增加,但钙盐沉积始终呈点灶状分布。通过 PepTag® Assay 法及 Western blot 半定量分析 PKC 活性水平,同样显示随着钙化不断加重,PKC 活性水平呈增加趋势。Pearson 相关性分析显示 PKC 活性水平与糖尿病足胫前动脉钙化积分正相关,提示可能是 PKCα 亚型发挥了促进钙化演进的作用。

有研究显示糖尿病大鼠平滑肌细胞中类似 PKC 激活的通路激活后促进骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达,而 Western blot 半定量分析表明抑制 PKC 后 OPN 表达下调,后者可将集中破骨细胞于骨吸收场所而促进骨吸收。此外,长期高血糖作用形成的糖基化晚期重要产物(advanced glycation end product, AGE)与其受体 RAGE 结合后通过 PKC ζ 触发一系列级联反应,包括 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)以增加成骨表型而减低平滑肌细胞表型^[11-12];抑制 PKCα 可增加碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)表达,而抑制 PKCβ 并未显著影响成骨细胞分化与增殖。提示 PKC 信号也参与血管钙化的过程,其中糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)主要通过 PKCα 及 PKCδ 信号调控血管壁平滑肌细胞钙化以增加成骨细胞表型 ALP、骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor-2, Runx-2)的表达,并降低平滑肌细胞表型 SM22α 水平^[13-14]。进而推测 PKC 可通过协同 OPN 或参与 p38 信号及转化生长因子 TGF-β 途径以参与糖尿病患者血管钙化的演进。

由于本研究的临床样本量很有限,有待进一步研究以再次验证其相关性,为此课题组希冀在动物和细胞水平进一步验证上述相关性并试图探究其具体机制。

[参考文献]

- [1] Nguyen N, Naik V, Speer MY. Diabetes mellitus accelerates cartilaginous metaplasia and calcification in atherosclerotic vessels of LDLR mutant mice[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22(2): 167-175.
- [2] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1 090-101.
- [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] Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, et al. PKC α suppresses osteoblastic differentiation[J]. *Bone*, 2011, 48(3): 476-484.
- [5] Yamagishi S, Matsui T. Smooth muscle cell pathophysiology and advanced glycation end products (AGEs) [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(7): 875-881.
- [6] McAlpine CS, Bowes AJ, Werstuck GH. Diabetes hyperglycemia and accelerated atherosclerosis: evidence supporting a role of endoplasmic reticulum(ER) stress signaling[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010, 10(2): 151-157.
- [7] Kataoka Y, Puri R, Hammadah M, et al. Spotty calcification and plaque vulnerability in vivo: frequency-domain optical coherence tomography analysis[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2014, 4(6): 460-469.
- [8] 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): 833-840.
- [9] 王中群, 李丽华, 严金川, 等. 糖基化终末产物与动脉粥样硬化的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(1): 94-100.
- [10] Lee K, Kim H, Jeong D. Protein kinase C regulates vascular calcification via cytoskeleton reorganization and osteogenic signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453(4): 793-797.
- [11] Kay A, Simpson C, Stewart J. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 6809703.
- [12] Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto KI, et al. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23132.
- [13] Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 106(8): 1 319-331.
- [14] Suga T, Iso T, Shimizu T. Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(8): 670-683.

(此文编辑 文玉珊)