

护骨素信号介导 Ghrelin 调控 A7r5 主动脉平滑肌细胞钙化

戴俏武¹, 王中群², 严金川², 邵晨², 孙振², 包正阳², 景乐乐², 李丽华³

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

[关键词] 胃促生长素; 护骨素; 细胞核因子 κ B 受体活化因子配体; 血管钙化

[摘要] **目的** 探讨胃促生长素(Ghrelin)与护骨素(OPG)/细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)在钙化发生过程中的调控机制。**方法** 首先观察高脂高糖培养基中 A7r5(主动脉平滑肌细胞)钙化过程中 Ghrelin 的变化情况, 继而观察外源性 Ghrelin 干预后高脂高糖钙化培养基中 A7r5 中 OPG、RANKL 的表达变化。最后观察 Ghrelin 与 OPG/RANKL 在钙化发生过程中的调控机制。各组细胞均于培养 14 天后进行相关检测(Von Kossa 染色、茜素红染色、细胞外钙沉积量测定、免疫组织化学染色、Western blot 检测)。**结果** Von Kossa 染色、茜素红染色及细胞外钙沉积量检测显示, 高脂高糖及 β -甘油磷酸盐模拟的糖尿病代谢紊乱环境下, A7r5 钙沉积量显著增加了 5.21 倍。Ghrelin 免疫组织化学染色及 IPP6 定量分析显示, 随着钙化的形成与发展, Ghrelin 表达明显下调。外源性 Ghrelin 可上调 OPG 相对表达量 6.25 倍。相对于高脂高糖钙化组, anti-OPG 组钙沉积量增加了 1.33 倍($P < 0.05$), RANKL 组钙沉积量增加了 1.59 倍($P < 0.05$); 相对于 anti-OPG 组, anti-OPG+Ghrelin 组钙沉积量下调了 41.9%($P < 0.05$); 相对于 RANKL 组, RANKL+Ghrelin 组钙沉积量下调了 57.8%($P < 0.05$)。**结论** OPG/RANKL 可介导 Ghrelin 调控 A7r5 主动脉平滑肌细胞钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study of Ghrelin regulating calcification in A7r5 aortic smooth muscle cells mediated by osteoprotegerin signaling

DAI Qiao-Wu¹, WANG Zhong-Qun², YAN Jin-Chuan², SHAO Chen², SUN Zhen², BAO Zheng-Yang², JING Le-Le², LI Li-Hua³
(1. Department of Science and Education, 2. Department of Cardiology, 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Ghrelin; Osteoprotegerin; Nuclear factor κ B receptor activator ligand; Vascular calcification

[ABSTRACT] **Aim** To observe the correlative mechanism between ghrelin and osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in A7r5 calcification. **Methods** Changes of ghrelin in A7r5 calcification under high-lipid, glucose-coexisting conditions were observed. And then, effects of OPG and RANKL regulated by exogenous ghrelin on A7r5 calcification under high-lipid, glucose, β -glycerophosphate-coexisting conditions were investigated. Finally, the interaction between OPG/RANKL and ghrelin in A7r5 calcification under high-lipid, glucose, β -glycerophosphate-coexisting conditions was explored. Von Kossa staining, alizarin red staining, extracellular calcium deposition assay, immunohistochemical staining, Western blot analysis were performed after incubation of 14 days. **Results** Von Kossa staining, alizarin red staining and extracellular calcium deposition test showed that calcium deposition of A7r5 cells significantly increased by 5.21 times under diabetic metabolic disorder simulated by high-lipid, glucose, β -glycerophosphate-coexisting conditions. Ghrelin immunohistochemical staining and IPP6 quantitative analysis indicated that the expression of ghrelin was dramatically reduced with the formation and development of calcification. Exogenous ghrelin could increase the relative expression of OPG by 6.25 times. Compared with the high glucose, high lipid and calcified group, the calcium deposition in anti-OPG group and RANKL group were raised by 1.33 times ($P < 0.05$) and 1.59 times ($P < 0.05$), respectively. Compared with anti-OPG group, the calcium deposition in anti-OPG plus ghrelin group was de-

[收稿日期] 2017-07-22

[修回日期] 2017-09-30

[基金项目] 国家自然科学基金(81370408, 81770450); 江苏省自然科学基金(BK20131246); 江苏省卫计委项目(Q201308, QNRC2016836); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX17_1801); 镇江市社会发展项目(SH2015038, SH2015023); 江苏大学临床专项(JDL CZX001)

[作者简介] 戴俏武, 副研究员, 研究方向为血管钙化的防控。通讯作者李丽华, 硕士, 主治医师, 主攻动脉粥样硬化分子病理, E-mail 为 328991181@qq.com。

creased by 41.9% ($P<0.05$); Compared with RANKL group, the calcium deposition in RANKL plus ghrelin group was decreased by 57.8% ($P<0.05$). **Conclusion** Ghrelin regulated A7r5 cells calcification by OPG/RANKL signal.

血管钙化(vascular calcification)是糖尿病、动脉粥样硬化、慢性肾病和高血压等多种疾病状态下加速不良事件发生的重要推手^[1]。其中,血管壁平滑肌细胞丢失原有表型而获得成骨表型是血管钙化发生的关键,但其机制一直未明^[2]。我们前期的研究显示,在糖尿病截肢患者,血清胃促生长素(Ghrelin)、护骨素(osteoprogenin,OPG)/细胞核因子 κ B受体活化因子配体(receptor-activator of nuclear factor kappa bata ligand,RANKL)水平对动脉粥样硬化斑块内不同级别钙化有一定预警价值^[3]。已知护骨素信号 OPG/RANKL 可高效耦联成骨与破骨间的动态平衡,OPG 拮抗钙化的发生,而 RANKL 则促进之^[4]。Ghrelin 是由 28 个氨基酸组成的肽类激素,在心血管系统中可发挥舒张血管、收缩心肌等多种生物学效应^[5]。但 Ghrelin 与 OPG/RANKL 系统在糖尿病动脉粥样硬化斑块内钙化的形成过程中的相互关系究竟如何,现有的研究尚不能给出满意的答复。为此,本研究拟从体外主动脉平滑肌细胞水平,观察高脂高糖环境下外源性 Ghrelin、中和性抗体 anti-OPG 和重组蛋白 RANKL 对钙化的影响,以期揭示 Ghrelin 与 OPG/RANKL 在钙化发生过程中的调控机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

A7r5 (主动脉平滑肌细胞株)购自中国科学院上海细胞库。 β -甘油磷酸盐购自美国 Sigma 公司。胎牛血清购自 Gibco 公司。钙含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Von Kossa 染色试剂盒购自上海舜百生物有限公司。anti-OPG 抗体、anti-RANKL 抗体和 anti-Ghrelin 抗体购自 Abcam (Cambridge, UK)。anti- β -actin 抗体和所有二抗购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。DAB 染色试剂盒购自福州迈新。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养与分组

A7r5 生长于含有 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基中,置于 37.5℃ 5%CO₂ 培养箱中培养,细胞长至 80%融合度时传代并进行干预。实验分三部分:①观察高脂高糖钙化培养基中 A7r5 钙化过程中 Ghrelin 的变化情况,分组如下:对照组、高脂组(600 μ mol/L 软脂酸)、高脂高糖组(25 mmol/L D-glucose +600 μ mol/L软脂酸)及高脂高糖钙化组(25 mmol/L

D-glucose +600 μ mol/L软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐)。②观察外源性 Ghrelin 干预后高脂高糖钙化培养基中 A7r5 中 OPG、RANKL 的表达变化,分组如下:高脂高糖钙化组(25 mmol/L D-glucose +600 μ mol/L软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐)、Ghrelin 干预组(25 mmol/L D-glucose+600 μ mol/L 软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐+10⁻⁵ mol/L Ghrelin)。③观察 Ghrelin 与 OPG/RANKL 在钙化发生过程中的调控机制,分组如下:高脂高糖钙化组(25 mmol/L D-glucose +600 μ mol/L软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐)、anti-OPG 组(25 mmol/L D-glucose+600 μ mol/L 软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐+100 mg/L anti-OPG 抗体)、anti-OPG + Ghrelin 组(25 mmol/L D-glucose +600 μ mol/L软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐 +1 mg/L anti-OPG 抗体 + 10⁻⁵ mol/L Ghrelin)、RANKL 组(25 mmol/L D-glucose+600 μ mol/L 软脂酸+10 mmol/L β -甘油磷酸盐+100 μ g/L RANKL)、RANKL +Ghrelin 组(25 mmol/L D-glucose +600 μ mol/L软脂酸 + 10 mmol/L β -甘油磷酸盐 + 100 μ g/L RANKL +10⁻⁵ mol/L Ghrelin)。以上各组连续 14 天 1%BSA 的培养基培养及干预后进行相关检测。

1.3 Von Kossa 染色及茜素红染色

对于 Von Kossa 染色,将实验结束的细胞吸弃培养基,PBS 洗涤 3 遍后,4%多聚甲醛固定 20 min,蒸馏水冲洗 2 次。加 5%硝酸银溶液,紫外线下 30 min,蒸馏水充分洗涤。5%硫代硫酸钠反应 5 min,蒸馏水充分洗涤。1%中性红溶液染色约 5 min,蒸馏水洗涤。梯度乙醇脱水,二甲苯溶液中透明后封固,光镜下观察细胞钙盐沉积情况并拍照。阳性区域为黑色钙沉积。对于茜素红染色,将细胞用磷酸缓冲盐水洗涤 2 次,在 4℃的 4%多聚甲醛中固定 5 min,室温下用 2%茜素红(pH 4.2)染色 5 min,用去离子水冲洗并拍照,阳性区域为红色钙沉积区。

1.4 细胞外钙沉积量测定

将实验结束的细胞吸弃培养基 PBS,洗涤 3 遍后,0.6 mmol/L 稀盐酸 37℃脱钙 24 h。邻甲-酚肽络合酮法测定盐酸悬液中钙含量。脱钙后的细胞以 BCA 法测定蛋白含量,以蛋白含量标化钙化量。

1.5 免疫组织化学染色

将实验结束的细胞吸弃培养基,PBS 洗涤 3 遍后,4%多聚甲醛固定 20 min,蒸馏水冲洗 2 次。0.3%过氧化氢甲醇 15 min,PBS 洗涤 5 min \times 3 次,BSA 封

闭,1:300 Ghrelin 一抗 4℃ 过夜, PBS 洗涤 5 min×3 次,生物素标记的二抗室温孵育 1 h, PBS 洗涤 5 min×3 次,加入辣根过氧化物试剂,37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 min×3 次,加入 DAB 显色 5~10 min,显微镜下观察着色情况适时终止反应。利用 Image Pro Plus 6 图像分析软件将阳性染色与背景分开进行自动测量,进行平均吸光度分析。每张切片选择 3 个不同视野,取平均值作为最终的平均吸光度值。

1.6 Western blot 检测

提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量并煮沸变性,电泳、转膜。5% 脱脂牛奶封闭,按比例(OPG 一抗稀释浓度 1:800, RANKL 一抗 1:500, β -actin 一抗 1:2000)加入一抗于 4℃ 孵育 12 h;TBST 洗涤 3 次后按 1:2000 比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育;TBST 洗 3 次;用 ECL 荧光检测试剂激发荧光,蛋白条带采用 UVP 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。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,正态分布计

量资料用 $\bar{x}\pm s$;非正态分布计量资料采用中位数±四分位数间距表示。两组间比较采用 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验。计数资料采用率或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂高糖环境下钙化 A7r5 主动脉平滑肌细胞 Ghrelin 表达的变化

Von Kossa 染色、茜素红染色及细胞外钙沉积量检测显示,高脂高糖及 β -甘油磷酸盐模拟的糖尿病代谢紊乱环境下,A7r5 钙沉积量显著增加;相对于对照组(1.31 ± 0.12 mmol/g),高脂高糖钙化组细胞外钙沉积量(6.83 ± 0.71 mmol/g)增加了 5.21 倍。Ghrelin 免疫组化染色及 IPP6 定量分析显示,随着钙化的形成与发展,Ghrelin 表达明显下调,从对照组的平均吸光度 187.52 ± 19.12 下降至高脂高糖钙化组的平均吸光度 20.92 ± 1.98 。综合三种染色的结果可知,钙化主动脉平滑肌细胞的 Ghrelin 表达下调(图 1)。

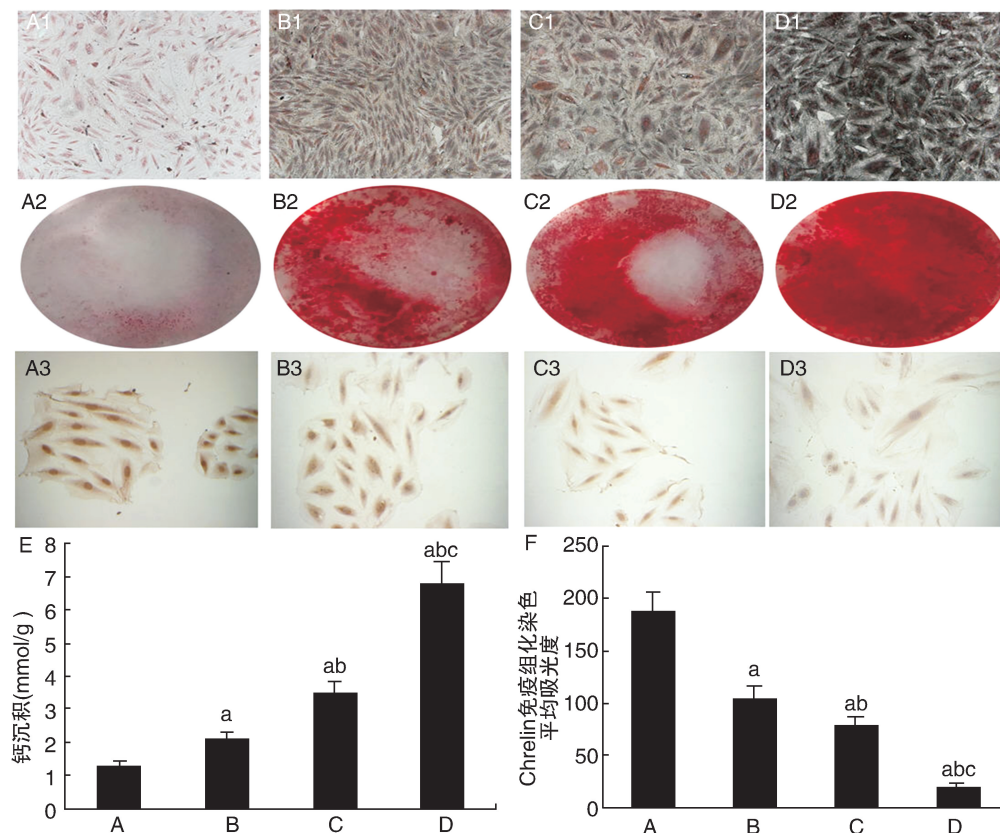


图 1. 高脂高糖环境下钙化 A7r5 主动脉平滑肌细胞 Ghrelin 表达的变化($n=5$) A1-D1 为 Von Kossa 染色,A2-D2 为茜素红染色,A3-D3 为 Ghrelin 免疫组织化学染色,E 为钙沉积定量分析图,F 为 IPP6 免疫组织化学半定量分析图。A 为对照组,B 为高脂组,C 为高脂高糖组,D 为高脂高糖钙化组。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与高脂组比较;c 为 $P<0.05$,与高脂高糖组比较。

Figure 1. Changes of ghrelin expression in calcified A7r5 aortic SMC under high-glucose and high-lipid conditions($n=5$)

2.2 Ghrelin 对 OPG/RANKL 表达的影响

Western blot 分析显示高脂高糖钙化环境中,外源性 Ghrelin 可上调 OPG 相对表达量 6.25 倍

(0.987 ± 0.086 比 0.158 ± 0.013 , $P < 0.05$), 下调 RANKL 相对表达量 43.0% (0.312 ± 0.028 比 0.547 ± 0.049 , $P < 0.05$) (图 2)。

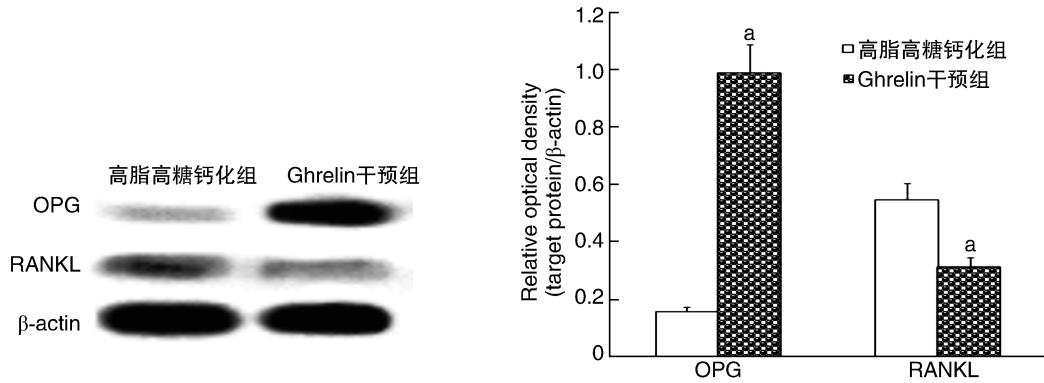


图 2. Ghrelin 对高脂高糖环境下钙化 A7r5 主动脉平滑肌细胞 OPG/RANKL 表达的影响 ($n=5$) a 为 $P < 0.05$, 与高脂高糖钙化组比较。
Figure 2. Effects of ghrelin on OPG/RANKL expression in calcified A7r5 aortic SMC under high-glucose and high-lipid conditions

2.3 Ghrelin 与 OPG/RANKL 在钙化发生过程中的调控关系

Von Kossa 染色及细胞外钙沉积量检测显示,相对于高脂高糖钙化组,anti-OPG 组钙沉积量增加了 1.33 倍 (9.514 ± 0.876 mmol/g 比 7.164 ± 0.683 mmol/g, $P < 0.05$), RANKL 组钙沉积量增加了 1.59 倍 (11.414 ± 1.376 mmol/g 比 7.164 ± 0.683 mmol/g, $P < 0.05$); 相对于

anti-OPG 组, anti-OPG + Ghrelin 组钙沉积量下调了 41.9% (5.524 ± 0.538 mmol/g 比 9.514 ± 0.876 mmol/g, $P < 0.05$); 相对于 RANKL 组, RANKL + Ghrelin 组钙沉积量下调了 57.8% (4.813 ± 0.495 mmol/g 比 11.414 ± 1.376 mmol/g, $P < 0.05$) (图 3)。综上, OPG/RANKL 可介导 Ghrelin 调控 A7r5 主动脉平滑肌细胞钙化。

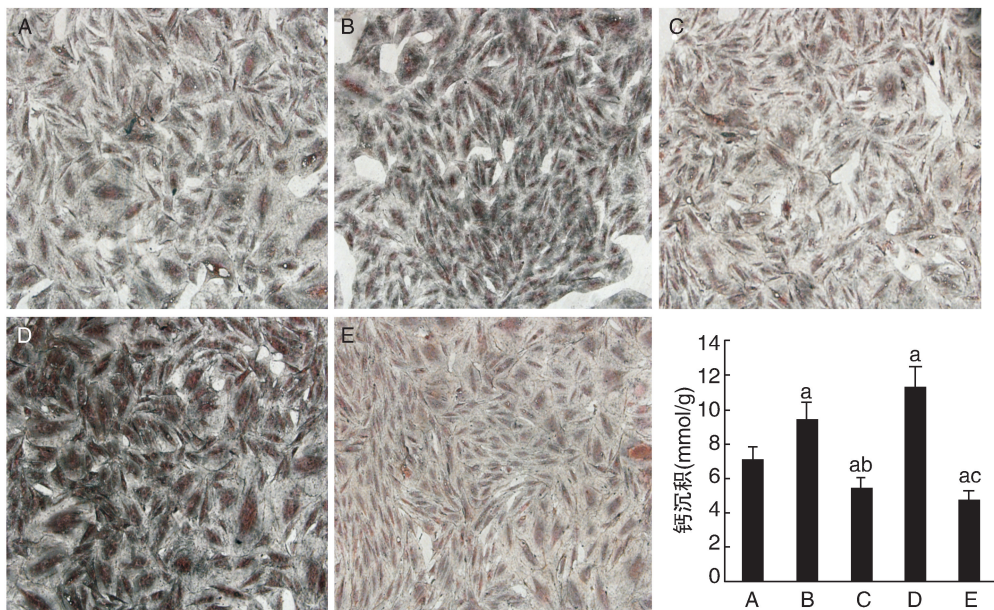


图 3. Ghrelin 与 OPG/RANKL 在钙化发生过程中的调控关系 ($n=5$) A 为高脂高糖钙化组, B 为 anti-OPG 组, C 为 anti-OPG+Ghrelin 组, D 为 RANKL 组, E 为 RANKL+Ghrelin 组。a 为 $P < 0.05$, 与高脂高糖钙化组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 anti-OPG 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 RANKL 组比较。
Figure 3. Interaction between ghrelin and OPG/RANKL in calcified A7r5 aortic SMC under high-glucose and high-lipid conditions ($n=5$)

Figure 3. Interaction between ghrelin and OPG/RANKL in calcified A7r5 aortic SMC under high-glucose and high-lipid conditions ($n=5$)

3 讨论

在糖毒性代谢中间体及其他多种病理因素刺激下,血管壁平滑肌细胞等间叶细胞发生成骨-成软骨细胞表型的转分化并进而介导羟基磷灰石钙盐主动沉积在血管壁形成血管钙化,是急性心肌梗死、主动脉夹层、血管撕裂、肢体缺血性坏疽等多种临床不良事件发生的重要原因^[6-7]。正是基于此原因,寻获启动糖尿病动脉粥样硬化血管壁平滑肌细胞发生表型转化的钙化级联信号及其传递路径一直是近年来血管钙化研究领域的焦点。

护骨素是一种分泌型糖蛋白和缺乏跨膜结构域的肿瘤坏死因子受体家族成员,广泛表达于各种成骨细胞、骨髓基质细胞、主动脉平滑肌细胞和内皮细胞等^[8]。最早以其抑制破骨细胞分化并上调骨密度的生物学效应而受到学术界的关注。以后随着研究的深入发现 OPG 作为一种诱饵受体,可结合并拮抗 OPG 配体的相应功能,例如 OPG 与 RANKL 竞争结合后,可高效抑制 RANKL/RANK 系统的作用,从而抑制破骨细胞形成、分化、存活及活性,促进其成骨作用^[9]。但由于骨-血管轴钙化异象的存在,对成骨作用的增强必定会抑制异位矿化例如血管钙化的形成^[4]。研究证实:OPG 缺陷小鼠成熟前即表现为严重的骨质疏松及主动脉、肾动脉的血管钙化,而重组 OPG 蛋白进行 OPG 缺陷小鼠的治疗可有效逆转骨质疏松和血管钙化的形成及演进^[10]。但 OPG/RANKL 系统究竟在糖尿病动脉粥样硬化斑块内钙化的形成过程中发挥了什么样的作用以及作用机制如何,既往的研究并不能给出满意的答复。

课题组前期研究显示^[3],糖尿病截肢患者随着下肢动脉粥样硬化斑块内钙化程度的加重,Ghrelin 与 OPG 表达下调,而 RANKL 上调。Ghrelin(胃促生长素)在神经内分泌、心血管、生殖、免疫等多个系统中发挥着重要作用;近期的研究显示,Ghrelin 可抑制炎症介质的释放及炎症通路的传递、放大,抑制单核细胞的内皮下迁徙,抑制巨噬细胞对脂质的吞噬和泡沫细胞的形成,抑制多种心脏病后的心律失常、心室重构,可有效改善心血管疾病的远期预后^[11]。为了进一步明确 Ghrelin 在糖尿病血管钙化中的作用及相关机制,本研究采用高脂高糖钙化培养基来模拟糖尿病的代谢紊乱,结果发现高脂高糖环境下钙化的主动脉平滑肌细胞 Ghrelin 表达显著下调。继之,用外源性 Ghrelin 干预钙化细胞其显著促进 OPG 的合成而抑制 RANKL 的表达,这与前期的临床研究相一致。进一步地,采用中和性 anti-

OPG 抗体及 RANKL 重组蛋白进行干预,发现 Ghrelin 与 OPG/RANKL 信号在主动脉平滑肌细胞钙化过程中存在着一定的调控关系,即护骨素信号 OPG/RANKL 可介导 Ghrelin 调控 A7r5 主动脉平滑肌细胞钙化。

本研究的创新之处在于在体外高脂高糖模拟的糖尿病钙化微环境中证实了 Ghrelin 与 OPG/RANKL 间的调控关系,与前述课题组的临床研究相结合有力地阐释了外源性多肽分子可有效靶向于钙化形成及演进,为未来的糖尿病大血管并发症的防治策略带来了新的切入点。

[参考文献]

- [1] Pérez-Hernández N, Aptilon-Duque G, Blachman-Braun R, et al. Vascular calcification: current genetics underlying this complex phenomenon [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(9): 1113-121.
- [2] 王中群,戴俏武,邵晨,等.血管钙化的骨调控机制新进展[J].*中华心血管病杂志*,2017,45(1):78-80.
- [3] 徐绥宁,李丽华,杜睿,等.Ghrelin 在糖尿病血管钙化中的作用[J].*中国动脉硬化杂志*,2016,24(9):929-933.
- [4] Znorko B, Oksztulska-Kolanek E, Michałowska M, et al. Does the OPG/RANKL system contribute to the bone-vascular axis in chronic kidney disease? A systematic review [J]. *Adv Med Sci*, 2017, 62(1): 52-64.
- [5] Yin Y, Zhang W. The role of Ghrelin in senescence: a mini-review [J]. *Gerontology*, 2016, 62(2): 155-62.
- [6] 叶斐,严金川,徐绥宁,等.血管钙化研究的新进展[J].*中华心血管病杂志*,2017,45(2):170-173
- [7] 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.
- [8] Harper E, Forde H, Davenport C, et al. Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: Integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 82: 30-40.
- [9] Makarovic S, Makarovic Z, Steiner R, et al. Osteoprotegerin and vascular calcification: clinical and prognostic relevance [J]. *Coll Antropol*, 2015, 39(2): 461-468.
- [10] Min H, Morony S, Sarosi I. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4): 463-474.
- [11] Lillenes BM, Frishman WH. Ghrelin and the cardiovascular system [J]. *Cardiol Rev*, 2016, 24(6): 288-297.

(此文编辑 许雪梅)