

## 姜黄素对维生素 D3 和尼古丁诱导血管钙化大鼠血管中组织蛋白酶 D 表达的影响

付尧, 吴冬冬, 李晓东

(中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 姜黄素; 血管钙化; 组织蛋白酶 D

[摘要] **目的** 研究组织蛋白酶 D(CTSD)在大鼠动脉钙化模型中的表达以及姜黄素对其表达的影响。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分成 3 组, 每组 10 只, 即对照组、钙化组和干预组。对照组大鼠给予等量生理盐水处理, 钙化组大鼠用维生素 D3 和尼古丁处理, 干预组大鼠在钙化组处理的基础上加用姜黄素干预。用 von Kossa 染色检测血管钙化, 试剂盒检测血管钙含量和碱性磷酸酶活性, Western blot 检测骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、Runx2 和 CTSD 的蛋白表达, 用免疫组织化学染色观察 CTSD 在血管中的表达及分布。**结果** 维生素 D3 和尼古丁能够诱导经典大鼠钙化模型, von Kossa 染色结果显示钙化组大鼠胸主动脉有大量黑色颗粒沉积, 血管钙含量和碱性磷酸酶活性升高, Western blot 检测结果显示 BMP-2 和 Runx2 表达显著上调; 使用姜黄素干预后, 与钙化组相比, 大鼠胸主动脉钙化程度明显减轻, 血管钙含量和碱性磷酸酶活性下降, BMP-2 和 Runx2 表达下调。免疫组织化学染色结果显示钙化组 CTSD 表达上调且大量分布在细胞外基质中, 姜黄素能够显著下调 CTSD 的表达并减少其在细胞外基质中的分布。**结论** 姜黄素具有抑制血管钙化的作用, 可能与其能够减少 CTSD 在细胞外基质中的表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of curcumin on the expression of cathepsin D in vascular calcification rats induced by Vitamin D3 and nicotine

FU Yao, WU Dong-Dong, LI Xiao-Dong

(Department of Cardiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Curcumin; Calcification; Cathepsin D

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of curcumin on vascular calcification in rat model. **Methods** 30 male SD rats were randomly divided into 3 groups, 10 in each group, namely the control group, the calcification group and the intervention group. Vitamin D3 and nicotine were used to establish vascular calcification model. Vascular calcification was detected by von Kossa staining, calcium content and the activity of alkaline phosphatase (ALP) were detected by kit, Western blot was used to detect the protein expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), Runx2 and cathepsin D (CTSD), immunohistochemical staining was used to observe the expression and distribution of CTSD in blood vessels. **Results** Vitamin D3 and nicotine could induce vascular calcification, increase calcium content and the activity of ALP, and upregulate the expression of BMP-2 and Runx2. Meanwhile, curcumin could play a protective effect against the vascular calcification, decrease calcium content and the activity of ALP, and downregulate the expression of BMP-2 and Runx2 induced by Vitamin D3 and nicotine. Furthermore, CTSD was upregulated and distributed in extracellular matrix after treated with Vitamin D3 and nicotine. Curcumin could downregulate the expression of CTSD and reduce its distribution in extracellular matrix. **Conclusion** Curcumin could inhibit vascular calcification in rat model induced by vitamin D3 and nicotine and it may play protective role via regulating the expression of CTSD.

血管钙化是指钙磷在血管壁的异常沉积, 经常出现在动脉粥样硬化斑块内、糖尿病和慢性肾病患者

[收稿日期] 2017-07-31

[修回日期] 2017-12-13

[作者简介] 付尧, 博士研究生, 讲师, 主治医师, 主要研究方向为冠心病、高血压、心力衰竭的发病机制, E-mail 为 1329658018@qq.com。通讯作者李晓东, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管疾病的诊断与治疗, E-mail 为 498423475@qq.com。

者中<sup>[1]</sup>。在血管钙化的发生发展过程中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的表型转化起着重要作用<sup>[2]</sup>。VSMC属于非终末分化细胞,生理状态下呈收缩表型,但在体外培养或血管壁损伤等情况下,可转变为具有合成和分泌功能的成骨样细胞表型,能分泌多种血管活性物质,在血管钙化的发生发展过程中起着关键作用<sup>[3]</sup>,但是其发病机制仍不清楚。

研究发现蛋白酶与血管钙化的发生密切相关<sup>[4]</sup>。蛋白酶是一大类能够水解蛋白质肽键的酶的总称,包括基质金属蛋白酶家族、丝氨酸蛋白酶家族、半胱氨酸蛋白酶家族和天冬氨酸蛋白酶家族等众多成员<sup>[5]</sup>。组织蛋白酶D(cathepsin D, CTSD)是天冬氨酸蛋白酶家族中的一员,其正常的功能是在溶酶体的酸性环境中水解蛋白质。研究发现急性冠状动脉综合征患者的巨噬细胞和血浆<sup>[6]</sup>以及动脉粥样硬化大鼠动脉组织中<sup>[7]</sup>的CTSD表达水平增加,提示其可能与心血管疾病有关。但是,CTSD在血管钙化中到底发挥什么作用尚需要大量的研究来证实。

姜黄素是从姜黄根茎中提取出来的一种天然多酚,近年来一系列研究表明其能够作用于多个信号通路,具有广泛的药理作用<sup>[8]</sup>。研究表明姜黄素能够通过p21抑制成骨细胞的矿化过程<sup>[9]</sup>,能够通过抑制JNK/Bax信号通路发挥抑制VSMC凋亡和钙化的作用<sup>[10]</sup>。然而,目前尚无体内实验证实姜黄素能够抑制血管钙化,以及其保护作用是否与组织蛋白酶有关。因此,本研究通过建立维生素D3和尼古丁诱导大鼠血管钙化模型,以证实姜黄素能够在体内发挥抑制血管钙化的作用且是否与CTSD有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

尼古丁、维生素D3、BMP-2、Runx2和GAPDH兔单抗(Sigma,美国);CTSD兔单抗(Millipore,美国);生物素标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz,美国);免疫荧光显微镜(Olympus,日本);蛋白凝胶电泳及转膜系统(Bio-Rad,美国);增强型化学发光试剂盒(Amersham,美国);雄性SD大鼠(中国医科大学实验动物中心);姜黄素(南京泽朗医药科技有限公司);钙检测试剂盒和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。其余试剂为市售分析纯产品。

### 1.2 大鼠血管钙化模型的制备

30只12±1周龄的雄性SD大鼠,体重200±20g,适应性喂养1周,自由饮食饮水。随机分成3组,每组10只:①对照组:不加任何干预,生理盐水0.2mL皮下注射,同时灌胃给予等量花生油;②钙化组:按照文献<sup>[11]</sup>方法,用维生素D3和尼古丁构建大鼠血管钙化模型。按30万IU/kg剂量肌肉注射维生素D3,并且将尼古丁溶于花生油后按25mg/kg剂量进行灌胃,9h后重复灌胃一次;③干预组:在给予同等剂量维生素D3和尼古丁基础上,将姜黄素溶于花生油后按100mg/kg剂量进行灌胃。所有大鼠均自由饮食饮水喂养4周后,颈椎脱臼处死。

### 1.3 von Kossa 染色

取大鼠胸主动脉,生理盐水冲洗血管腔去除残留血液,常规石蜡包埋后进行组织切片、脱蜡、脱水:①将样本浸入5%AgNO<sub>3</sub>溶液中,紫外灯照射30min;②再将样本放入2.5%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液中,定影5min;③使用碱性品红复染后,进行脱水、透明、封片处理,在光镜下观察。

### 1.4 HE 染色

取大鼠胸主动脉,生理盐水冲洗血管腔去除残留血液,常规石蜡包埋后进行组织切片、脱蜡、脱水:①加入到苏木精染液中染色3min,自来水冲洗;②加入盐酸酒精分化,自来水冲洗;③加入到伊红染液中染色2min,自来水冲洗;④酒精脱水后用二甲苯透明;⑤用中性树胶封固后,在光镜下观察。

### 1.5 Western blot 检测蛋白表达

总蛋白提取:取大鼠胸主动脉,生理盐水冲洗血管腔去除残留血液,用眼科剪将血管剪碎,放入匀浆器中,加入500μL组织裂解液,充分研磨后冰点孵育30min;涡旋振荡3min,重复操作3次;离心(12000r/min, 20min, 4℃)后吸取上清即为总蛋白。使用BCA法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量;加入5×buffer,混匀后95℃变性5min;制备12%SDS-PAGE分离胶,用微量加样器每孔加入10μg蛋白质样品;经电泳、转膜后用5%脱脂奶粉封闭2h;充分漂洗后加入一抗稀释液(1:1000稀释),4℃冰箱中过夜孵育;充分漂洗后加入二抗稀释液(1:5000稀释),室温下摇床振荡2h;再次洗脱3次后,使用美国Amersham增强型化学发光试剂盒发光显影,用化学发光凝胶成像系统对其进行曝光及图像分析软件进行分析;使用Image J对条带进行量化。

### 1.6 免疫组织化学染色检测CTSD表达及分布

取胸主动脉进行石蜡包埋后切片,将组织切片脱蜡至水,将组织切片放在沸水中,用枸橼酸缓冲

液修复抗原,加入山羊血清封闭液,置室温下封闭 10 min,加入 1:300 CTSD 抗体,置 4℃ 冰箱中过夜,将组织切片置 37℃ 恒温箱中复温 45 min,加入聚合物增强剂反应 10 min,PBS 冲洗 5 min,共 2 次,加入酶标二抗反应 10 min,PBS 冲洗 5 min,共 2 次,DAB 显色 2 min,PBS 洗涤 3 次,苏木精染色 1 min,盐酸酒精处理数秒,自来水冲洗 10 min;脱水、封片、镜检。

### 1.7 大鼠胸主动脉组织钙含量测定

取大鼠胸主动脉组织,用预冷的 PBS 冲洗干净,置 55℃ 恒温箱中烘干,加入 65% HNO<sub>3</sub>,置 37℃ 恒温箱中脱钙,提取上清液。根据试剂盒说明,用邻甲-酚酞络合酮法测定钙含量。剩余组织加入细胞裂解液,BCA 法检测细胞总蛋白含量,用蛋白含量对细胞钙含量进行标准化,最后以  $\mu\text{mol/g protein}$  表示。

### 1.8 大鼠胸主动脉碱性磷酸酶活性测定

将组织剪碎后加入裂解液,超声波粉碎。根据试剂盒说明书,依次加入酚标准液、待测样本、缓冲液、基质液、显色液等,充分混匀后放置在 37℃ 水浴中,孵育 5~10 min,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  反应终止液终止反应,于 405 nm 测定吸光度。碱性磷酸酶活性用每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用产生 1 mg 作为 1 个

金氏单位并以蛋白含量标准化,最后以 U/g protein 表示。

### 1.9 统计学分析

各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠胸主动脉 HE 染色情况

HE 染色结果显示,对照组大鼠动脉组织血管内膜光滑,血管中层平滑肌细胞排列整齐、连续;钙化组大鼠动脉组织血管内膜不平整,中层平滑肌细胞排列紊乱,弹力纤维断裂;干预组大鼠动脉组织血管内膜和中层平滑肌破坏不明显(图 1)。

### 2.2 姜黄素明显减轻血管钙化

von Kossa 染色结果显示,与对照组相比,维生素 D3 和尼古丁能够显著诱导大鼠动脉组织钙化,可见动脉中膜出现大量棕黑色颗粒,沿弹力纤维线性分布,主要沉积于平滑肌细胞和细胞外基质中;加入姜黄素干预后,与钙化组相比,血管中膜棕黑色颗粒显著减少,表明姜黄素能够显著减轻血管钙化(图 2)。

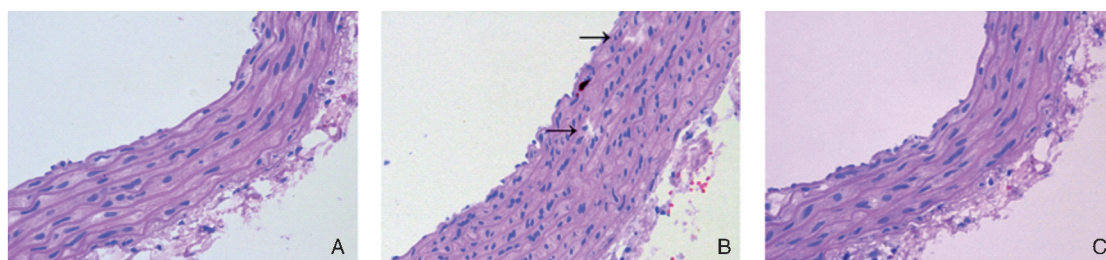


图 1. 动脉组织 HE 染色结果(400×) A 为对照组,B 为钙化组,C 为干预组。黑色箭头所指为弹力纤维断裂。

Figure 1. The results of HE staining in arterial tissue(400×)

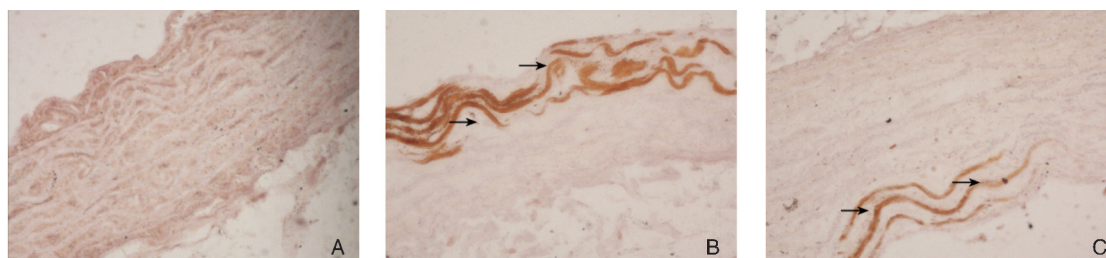


图 2. 姜黄素明显减轻血管钙化(400×) A 为对照组,B 为钙化组,C 为干预组。黑色箭头所指为钙化。

Figure 2. Curcumin cloud obviously inhibit vascular calcification(400×)

### 2.3 姜黄素对钙化血管中钙含量和碱性磷酸酶活性的影响

与对照组相比,模型组钙含量和碱性磷酸酶活

性显著增加,分别增加 19.04 倍( $237.69 \pm 24.35 \mu\text{mol/g protein}$  比  $12.48 \pm 2.56 \mu\text{mol/g protein}$ ,  $P < 0.05$ )和 10.28 倍( $168.43 \pm 16.54 \text{ U/g protein}$  比  $16.38$



$\pm 3.57$  U/g protein,  $P < 0.05$ )。与模型组相比,姜黄素能够显著降低钙含量和碱性磷酸酶活性,分别降低 2.42 倍 ( $98.21 \pm 8.73$   $\mu\text{mol/g}$  protein 比  $237.69 \pm$

$24.35$   $\mu\text{mol/g}$  protein,  $P < 0.05$ ) 和 2.51 倍 ( $67.20 \pm 8.57$  U/g protein 比  $168.43 \pm 16.54$  U/g protein,  $P < 0.05$ ; 图 3)。

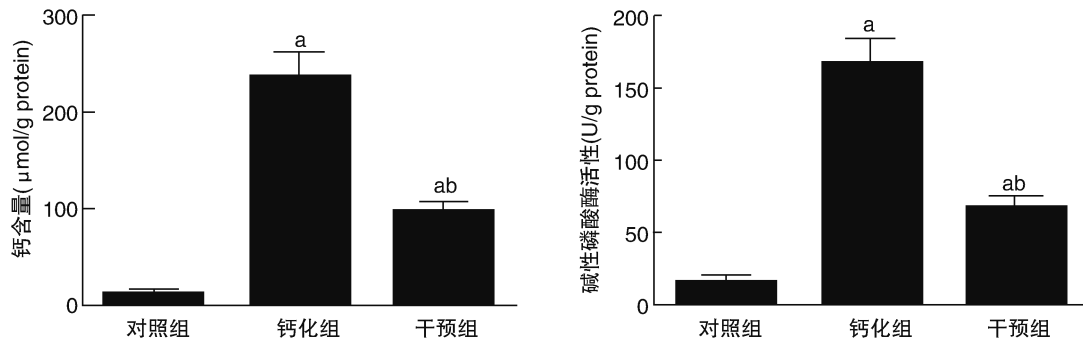


图 3. 姜黄素对钙化血管中钙含量和碱性磷酸酶活性的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

Figure 3. Effects of curcumin on calcium content and the activity of alkaline phosphatase in calcified vascular ( $n=3$ )

#### 2.4 姜黄素对钙化血管中 BMP-2 和 Runx2 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组相比,维生素 D3 和尼古丁能够显著上调 BMP-2 和 Runx2 的表

达,分别升高  $42.73 \pm 4.26$  倍和  $23.48 \pm 2.73$  倍;与钙化组相比,姜黄素能够显著降低 BMP-2 和 Runx2 的表达水平,表明姜黄素具有改善血管钙化的作用 (图 4)。

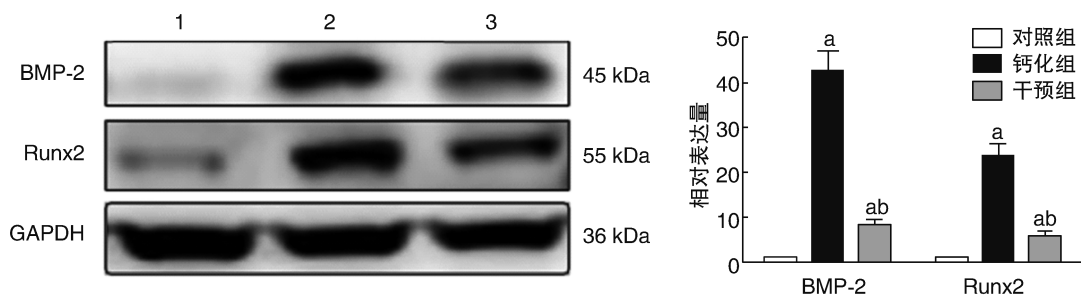


图 4. 姜黄素对钙化血管中 BMP-2 和 Runx2 蛋白表达的影响 ( $n=3$ ) 1 为对照组,2 为钙化组,3 为干预组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

Figure 4. Effect of curcumin on the expression of BMP-2 and Runx2 protein in calcified vascular ( $n=3$ )

#### 2.5 姜黄素对钙化血管中 CTSD 蛋白表达的影响

免疫组织化学染色结果显示,钙化组 CTSD 表达显著上调,而且弥漫分布于血管中膜细胞外基质内,姜黄素能够显著减少细胞外基质内 CTSD 的分布。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,维生素 D3 和尼古丁能够显著上调 CTSD 的表达 ( $P < 0.05$ );加入姜黄素干预后,与钙化组相比,CTSD 蛋白表达得到显著恢复 ( $P < 0.05$ ; 图 5)。

目前其发病机制及寻求药物治疗靶点已经成为研究热点。本研究发现,在维生素 D3 和尼古丁诱导血管钙化的经典模型中,血管中膜出现典型的钙化结节,这与文献<sup>[12]</sup>报道一致。经过姜黄素干预后,血管组织中成骨蛋白 BMP-2 和 Runx2 表达水平下降,血管钙化程度减轻,提示姜黄素具有抑制血管钙化的作用。

目前关于姜黄素对 VSMC 成骨样分化和钙化的影响的研究较少。Hou 等<sup>[10]</sup>研究发现,在细胞实验中,姜黄素能够抑制高钙高磷诱导的 VSMC 成骨样分化和钙化,其机制很可能与 JNK/Bax 凋亡信号有关。目前尚未见姜黄素能否在体内发挥抑制血管

### 3 讨论

血管钙化是多种心血管疾病的共同发病基础,

钙化的报道。本研究首次发现,姜黄素能抑制大鼠

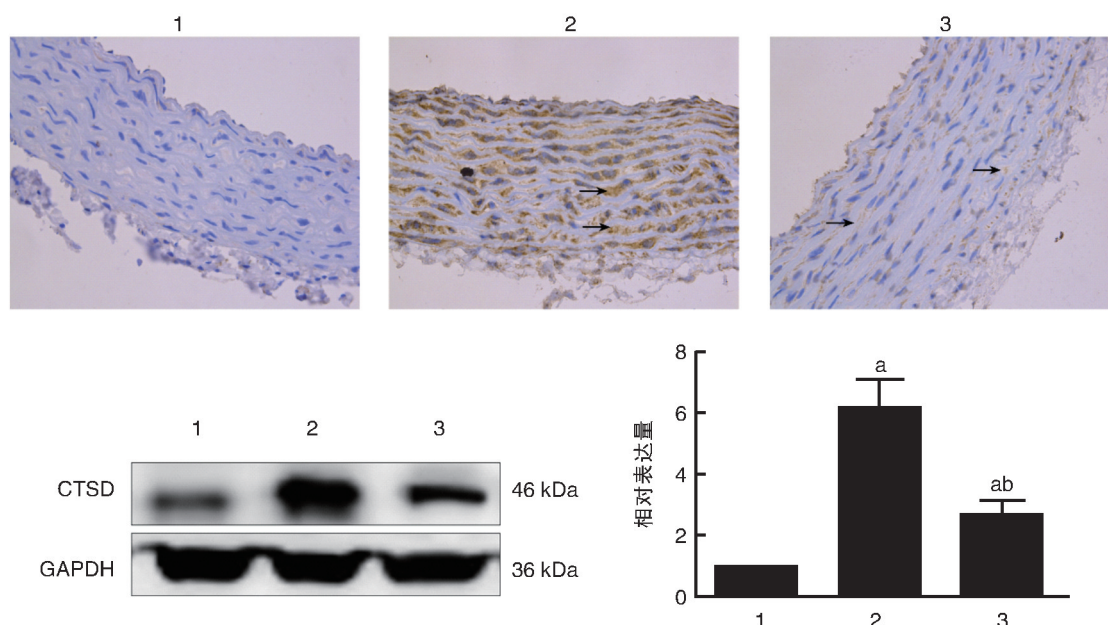


图 5. 姜黄素对钙化血管中 CTSD 蛋白表达的影响 ( $n=3$ ) 上图为免疫组织化学染色检测 CTSD 的表达及分布 (400 $\times$ ), 黑色箭头所指棕色颗粒为 CTSD 表达; 下图为 Western blot 检测 CTSD 蛋白表达。1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为干预组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

Figure 5. Effect of curcumin on the expression of CTSD protein in calcified vascular ( $n=3$ )

血管钙化。血管钙化是一个由细胞介导的、主动的、可以调节的过程,在其发生发展过程中 VSMC 的表型转化起着重要作用<sup>[1]</sup>。VSMC 的表型转化伴随着其增殖和迁移能力的改变<sup>[2]</sup>。研究表明,姜黄素可以通过调节 MAPK 信号通路使 VSMC 的细胞周期停滞在 G1/S 阶段而抑制其增殖<sup>[13]</sup>,也有研究报道姜黄素可以通过调节 ERK/Akt 信号通路而抑制 VSMC 的增殖和迁移<sup>[14]</sup>。此外,姜黄素还能通过调节血小板源性生长因子和血管内皮生长因子等一系列细胞因子减轻血管重塑<sup>[15]</sup>。因此,姜黄素可能是通过抑制 VSMC 增殖和迁移而发挥抑制血管钙化作用的。

既往研究认为组织蛋白酶主要在溶酶体内降解受损和衰老的蛋白质和细胞器,将其分解成小分子氨基酸等用于生物合成。但是近年来研究发现,组织蛋白酶家族成员在细胞外基质重塑、细胞间质降解、细胞内信号转导和细胞凋亡的过程中均发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。在细胞实验中,有研究发现细胞内 CTSD 表达水平下降能够促进 VSMC 增殖和迁移<sup>[8]</sup>。CTSD 是自噬-溶酶体途径降解受损细胞器和蛋白质的执行蛋白,其表达水平及活性受抑制能够抑制晚期自噬功能,从而促进 VSMC 增殖和迁移<sup>[8]</sup>。Sudo 等<sup>[16]</sup>研究发现 7-酮胆固醇能够抑制细

胞内 CTSD 的水平,引起溶酶体肿胀,自噬小体与溶酶体融合受阻,进而促进 VSMC 钙化。细胞内蛋白质水平的变化不足以说明其表达是上调还是下调,因为蛋白质分泌到细胞外参与细胞外基质降解和重塑时,可以表现为总体蛋白水平表达上调而细胞内蛋白水平下调。因此,尽管体外实验证实 CTSD 的细胞内水平下降能够促进 VSMC 增殖、迁移和细胞钙化,尚需要体内实验进一步证实 CTSD 在血管钙化中的作用。Twardowski 等<sup>[11]</sup>在主动脉瓣硬化患者行瓣膜置换手术时纳入 68 例主动脉瓣膜组织,基因表达谱和免疫组织化学检测均证实 CTSD 在钙化组织中总体是上调的,其被大量释放到细胞外基质中,参与重塑和钙化过程。本研究中,免疫组织化学染色结果也发现 CTSD 在钙化组织中大量分布到细胞外基质中。因此,推论 CTSD 在促进 VSMC 表型转化和血管钙化的过程中发挥重要作用。

综上所述,姜黄素具有抑制血管钙化的作用,可能与其减少 CTSD 释放,抑制细胞外基质重塑有关。综合文献报道和该研究结果,姜黄素作为能够成为抑制血管钙化的药物,具有广阔的研发前景。

#### [参考文献]

- [1] 严泽振, 沈玲红, 何奔. 血管钙化中成骨样细胞来源及其转化的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25

- (11): 1 169-173.
- [2] Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, et al. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179: 1 594-600.
- [3] Han M, Wen JK, Zheng B, et al. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291: C 50-58.
- [4] 贾小英, 危当恒. 组织蛋白酶 L 与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(1): 85-88.
- [5] 刘玉胜, 鹿庆华, 蒋卫东. 组织蛋白酶与细胞外基质重塑[J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(9): 1 037-040.
- [6] Goncalves I, Hultman K, Duner P, et al. High levels of cathepsin D and cystatin B are associated with increased risk of coronary events[J]. *Open Heart*, 2016, 3: e000353.
- [7] 张志钢, 张晓兰, 舒青, 等. 动脉粥样硬化大鼠动脉组织中组织蛋白酶 D 的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(6): 461-464.
- [8] 周瑶瑶, 张俊峰. 姜黄素在心血管疾病中的应用[J]. *国际心血管病杂志*, 2015, 42(1): 41-43.
- [9] Notoya M, Nishimura H, Woo JT, et al. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 534: 55-62.
- [10] Hou M, Song Y, Li Z, et al. Curcumin attenuates osteogenic differentiation and calcification of rat vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420: 151-160.
- [11] Twardowski L, Cheng F, Michaelsen J, et al. Enzymatically modified low-density lipoprotein is present in all stages of aortic valve sclerosis: Implications for pathogenesis of the disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4: e002156.
- [12] Zhang X, Xiao J, Li R, et al. Metformin alleviates vascular calcification induced by vitamin D3 plus nicotine in rats via the AMPK pathway [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 81: 83-90.
- [13] Qin L, Yang YB, Tuo QH, et al. Effects and underlying mechanisms of curcumin on the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by Chol; MbetaCD [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2): 277-282.
- [14] Yang X, Thomas DP, Zhang X, et al. Curcumin inhibits platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell function and injury-induced neointima formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 85-90.
- [15] Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression [J]. *Biofactors*, 2013, 39: 37-55.
- [16] Sudo R, Sato F, Azechi T, et al. 7-Ketocholesterol-induced lysosomal dysfunction exacerbates vascular smooth muscle cell calcification via oxidative stress [J]. *Genes Cells*, 2015, 20: 982-991.
- (此文编辑 文玉珊)