

生长激素释放激素受体激动剂 MR409 减轻 糖尿病 Db/Db 小鼠血管钙化

薛锐泽, 蔡瑞平, 唐琪, 刘月阳, 徐茜, 周明生

(沈阳医学院基础医学院生理学教研室, 辽宁省沈阳市 110034)

[关键词] 生长激素释放激素受体激动剂; MR409; 血管钙化; 钙盐沉积; Runt 相关转录因子 2; 血管舒张; Db/Db 小鼠

[摘要] 目的 研究生长激素释放激素受体激动剂 MR409 对基因缺陷小鼠 Db/Db 糖尿病小鼠(Db/Db 小鼠)血管钙化(VC)的保护作用。方法 以 12 周龄雄性野生型(WT)C57BL/6 小鼠为 WT 组(对照组), 12 周龄雄性 Db/Db 小鼠随机分为 Db/Db 组(糖尿病组)和 MR409 组(MR409 治疗组)。MR409 组隔天给予 MR409(15 μ g/次)治疗 8 周。第 8 周末, 检测小鼠血清碱性磷酸酶(ALP)和血糖水平。HE 染色观察小鼠主动脉形态变化。von Kossa 染色、茜素红染色检测主动脉钙盐沉积。离体血管灌注系统测定内皮依赖性血管舒张功能。免疫组织化学染色检测主动脉钙化相关蛋白 Runt 相关转录因子 2(Runx2)蛋白表达。二氢乙锭荧光染色检测主动脉活性氧(ROS)水平。结果 与 WT 组比较, Db/Db 组血清 ALP 活性升高, 血管壁厚度增加, 血管舒张功能降低, 主动脉 ROS 水平增加($P < 0.05$); 与 Db/Db 组比较, MR409 组 ALP 活性降低, 主动脉肥厚减轻, 血管舒张功能改善, 主动脉 ROS 水平降低($P < 0.05$)。与 WT 组比较, Db/Db 组有明显的 VC, 表现为主动脉钙盐沉积增加, Runx2 蛋白表达升高($P < 0.05$); 与 Db/Db 组比较, MR409 组主动脉钙盐沉积减轻, Runx2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。结论 MR409 能显著抑制糖尿病小鼠 VC, 减轻主动脉增厚, 改善血管内皮功能, 其机制可能与抑制氧化应激诱导的 Runx2 表达升高有关。

[中图分类号] R363;R54

[文献标识码] A

Growth hormone releasing hormone receptor agonist MR409 attenuates vascular calcification in diabetic Db/Db mice

XUE Ruize, CAI Ruiping, TANG Qi, LIU Yueyang, XU Qian, ZHOU Mingsheng

(Department of Physiology, Shenyang Medical University, Shenyang, Liaoning 110034, China)

[KEY WORDS] growth hormone releasing hormone receptor agonist; MR409; vascular calcification; calcium salt deposition; Runt-related transcription factor 2; vasodilation; Db/Db mice

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of growth hormone releasing hormone receptor agonist MR409 on vascular calcification (VC) in gene deficient mice Db/Db diabetic mice (Db/Db mice). **Methods** With 12-week-old male wild-type (WT) C57BL/6 mice as the WT group (control group), 12-week-old male Db/Db mice were randomly divided into Db/Db group (diabetes group) and MR409 group (MR409 treatment group). MR409 group was given MR409 (15 μ g/time) every other day for 8 weeks. At the end of the 8th week, the mouse serum alkaline phosphatase (ALP) and blood glucose levels were tested. HE staining was used to observe the morphological changes of aorta in mice. Calcium salt deposition in aorta was detected by von Kossa staining and alizarin red staining. Endothelium-dependent vasodilation function was measured by in vitro vascular perfusion system. Aortic calcification-related protein Runt-related transcription factor 2 (Runx2) protein expression was detected by immunohistochemical staining. Aortic reactive oxygen species (ROS) level was detected by dihydroethidium fluorescent staining. **Results** Compared with WT

[收稿日期] 2020-11-12

[修回日期] 2021-02-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81970357);沈阳医学院博士科研启动基金项目(2018056);沈阳医学院硕士研究生科技创新基金项目(Y20190504)

[作者简介] 薛锐泽, 硕士研究生, 研究方向为血管生物学, E-mail 为 k33476718424@163.com。通信作者周明生, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血管生物学, E-mail 为 zhoums1963@163.com。

group, serum ALP activity increased, blood vessel wall thickness increased, vasodilation function decreased, and aortic ROS level increased in Db/Db group ($P < 0.05$). Compared with Db/Db group, ALP activity decreased, aortic hypertrophy decreased, vasodilation function improved, and ROS level of aorta decreased in MR409 group ($P < 0.05$). Compared with WT group, there was significant VC in Db/Db group, which showed increased calcium salt deposition and increased Runx2 protein expression in aorta ($P < 0.05$). Compared with Db/Db group, calcium salt deposition and Runx2 protein expression in aorta were decreased in MR409 group ($P < 0.05$). **Conclusion** MR409 can significantly inhibit VC, reduce aortic hypertrophy and improve vascular endothelial function in diabetic mice, and its mechanism may be related to the inhibition of the increase of Runx2 expression induced by oxidative stress.

血管钙化 (vascular calcification, VC) 是一种以钙磷在血管异常沉着为特征的病理状况^[1]。VC 可分为血管内膜钙化和中层平滑肌钙化, 其中血管中层钙化是最常见的 VC 类型, 常发生在糖尿病、终末期肾病以及衰老等^[2]。据报道, 2 型糖尿病患者中有 VC 者高达 41.5%, 而慢性终末期肾病患者的 VC 患病率也高达 27%, 是导致慢性终末期肾病患者心血管疾病发生和猝死的原因^[3]。钙化血管增加血管的僵硬性, 降低血管壁弹性和顺应性^[4]。

VC 的机制尚未完全了解。VC 与骨骼中钙磷沉积的过程非常相似, 一些调节骨骼钙磷代谢的信号通路分子, 如碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素、骨桥蛋白^[5]、钙化相关蛋白 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 等可能也参与 VC 的过程^[6]。迄今为止, 临床上对 VC 尚缺乏有效的治疗方法, 通过治疗肾脏疾病、心血管病和糖尿病等原发性疾病可能延缓但不能阻止 VC 发生和发展, 而一些基于抑制钙磷结晶生长治疗 VC 的药物尚处于动物实验或小规模临床研究中^[7]。因此, 迫切需要研发一些新的预防或治疗 VC 药物。

生长激素释放激素 (growth hormone releasing hormone, GHRH) 是一种下丘脑神经肽, 它与 GHRH 受体 (一种 G 蛋白偶联受体) 结合, 可刺激垂体的生长激素 (growth hormone, GH) 分泌和合成^[8]。除了在中枢垂体外, GHRH 及其受体还作用和表达在不同的外周组织及细胞, 如心肌细胞^[9]、血管平滑肌细胞、眼组织和胰腺^[10], 从而赋予 GHRH 具有更为广泛的生物效应。MR409 是一种人工合成的 GHRH 类似物, 它是 GHRH 受体激动剂 (growth hormone releasing hormone receptor agonist, GHRHR-A)。与天然 GHRH 相比, MR409 具有更高的受体亲和力和稳定性、药物半衰期长、无诱发肿瘤生长等不良反应的优点。一些研究表明长期的 MR409 治疗对实验性急性心肌梗死^[11]、心力衰竭、糖尿病性视网膜病变^[12] 等具有良好的血管保护效应。最近, Shen

等^[13] 研究表明, MR409 可通过阻断核因子 κ B/活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 信号途径, 抑制体外培养的血管平滑肌细胞的钙化, 以及降低骨保护素去基因小鼠诱导的 VC 过程。然而, 在人类自然疾病中, 如糖尿病、动脉粥样硬化等, 目前尚无文献报道。基因缺陷小鼠 Db/Db 糖尿病 (diabetes) 小鼠 (Db/Db 小鼠) 是模拟人类 2 型糖尿病良好的动物模型, 该鼠在 4 ~ 5 月龄可发生 VC。本文研究了 MR409 对基因缺陷小鼠 Db/Db 小鼠引起的 VC 的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

MR409 由迈阿密大学 Andrew Schally 实验室合成并赠送, ALP 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), HE 染色试剂盒 (北京索莱宝公司), 改良茜素红 S 染色试剂盒 (北京索莱宝公司), von Kossa 染色试剂盒 (北京索莱宝公司), 二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 染色液 (Sigma-Aldrich 公司), 去甲肾上腺素 (Sigma-Aldrich 公司), 乙酰胆碱 (Sigma-Aldrich 公司), 小鼠 SP 免疫组织化学染色试剂盒 (北京中杉金桥公司), 小鼠单克隆抗体 Runx2 (1 : 50 稀释, Santa Cruz 公司)。

1.2 实验动物及分组

12 周龄雄性 Db/Db 小鼠 16 只, 体重 (48 ± 4) g, 和野生型 (wild type, WT) C57BL/6 小鼠 8 只, 体重 (27 ± 2) g, 购自南京大学动物模型研究中心。小鼠饲养于沈阳医学院实验动物中心, SPF 级, 维持环境温度 (室温) 在 (23 ± 2) °C, 光/暗循环 12 h, 小鼠可自由饮水及取食。适应性喂养 2 周后, 以 WT 小鼠为 WT 组 (对照组), Db/Db 小鼠随机分为 Db/Db 组 (糖尿病组) 和 MR409 组 (MR409 治疗组), MR409 组每隔 1 天给予皮下注射 MR409 (溶于含有 1% 二甲基亚砷的 10% 丙二醇溶液中) 1 次, 15 μg/次, 治疗 8 周, WT 组和 Db/Db 组皮下注射等量溶

剂。治疗结束后,小鼠禁食 8~10 h,以 1% 戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉小鼠后,打开胸腔和腹腔,分离主动脉,剔除周围脂肪,收集标本于-80 °C 冰箱保存,4% 多聚甲醛固定。

1.3 ALP 和血糖检测

血清 ALP 测定:用 ALP 测定试剂盒,根据试剂盒说明书步骤(微板法)测定血 ALP 活性。空腹血糖测定:用试纸条(葡萄糖氧化酶法)测尾静脉血糖(通过剪切部分小鼠尾巴取血)。

1.4 主动脉 HE 染色

主动脉于 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,取 4 μm 厚度切片进行 HE 染色。实验每组选取 8 个样本,普通光学显微镜下观察各组主动脉形态变化,用 Image J 分析血管厚度来评价血管形态学变化。

1.5 主动脉 von Kossa 染色

石蜡切片在 von Kossa 银溶液中强光照射 15 min,海波溶液处理 2 min,HE 染色液复染,中性树脂封片。实验每组选取 8 个样本,普通光学显微镜下观察各组主动脉钙盐沉积情况,用 Image-Pro Plus 分析黑色钙盐沉积面积百分比。

1.6 主动脉茜素红染色

石蜡切片于茜素红染色液中滴染 2 min,稍微水洗,McGee-Russell 分化液分化,Mayer 苏木精浅染细胞核。实验每组选取 8 个样本,普通光学显微镜下观察各组主动脉钙盐沉积情况,Image-Pro Plus 分析橘红色钙盐沉积面积百分比。

1.7 主动脉舒张功能检测

以 1% 戊巴比妥钠麻醉,开胸,分离主动脉,取胸降主动脉中部切成 3 mm 主动脉环。使用离体血管灌流系统检测乙酰胆碱诱导的主动脉环内皮依赖性血管舒张功能。主动脉环用 30 nmol/L 去甲肾上腺素收缩至最大收缩幅度的 70%,然后添加累积剂量的乙酰胆碱(10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L)舒张血管,观察血管舒张程度及舒张曲线。

1.8 免疫组织化学染色检测主动脉 Runx2 蛋白表达

石蜡组织切片放入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中高压修复 3 min,内源性过氧化物酶室温孵育,山羊血清封闭;滴加 Runx2 抗体(1:50 稀释),4 °C 孵育过夜;生物素标记山羊抗小鼠室温孵育,辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育,联苯二胺显色;苏木精复染后,用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算平均光密度(mean optical density,MOD)值。

1.9 DHE 法检测主动脉 ROS 水平

通过氧化荧光染料 DHE 测定主动脉环中 $O_2^{\cdot-}$ 的产生。取 4 μm 厚度的石蜡切片浸入含有 2 μmol/L DHE 的 HEPES 缓冲液中,37 °C 避光孵育 30 min;采用 Leica 荧光显微镜摄取图片,用双盲设计评价主动脉环内皮层和平滑肌层产生 $O_2^{\cdot-}$ 的 DHE 荧光强度。

1.10 统计学分析方法

采用 Image J 和 Image-Pro Plus 图像分析软件对各染色图片进行定量分析。所有的数据用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。血管舒张功能数据采用多因素方差分析,其余数据多组间比较均采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠 ALP、血糖和体质量比较

取第 8 周末小鼠血检测 ALP 和血糖,结果显示,与 WT 组相比,Db/Db 组 ALP 活性、血糖水平和体质量明显升高($P<0.05$);与 Db/Db 组比较,MR409 组 ALP 活性明显降低($P<0.05$;图 1 和表 1)。

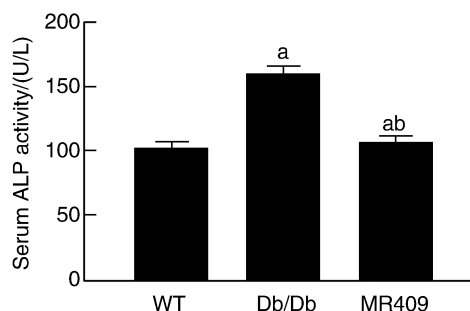


图 1. 3 组小鼠血清 ALP 活性比较($n=8$)

a 为 $P<0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P<0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 1. Comparison of serum ALP activity in three groups of mice ($n=8$)

表 1. 3 组小鼠 ALP、血糖和体质量比较

Table 1. Comparison of ALP, blood sugar and body weight of three groups of mice

项目	WT 组	Db/Db 组	MR409 组
ALP/(U/L)	103.261±0.36	160.762±0.49 ^a	107.314±0.43 ^{ab}
血糖/(mmol/L)	5.467±0.02	23.925±1.10 ^a	24.563±0.39
体质量/g	23.339±0.77	53.529±1.31 ^a	52.188±2.59

a 为 $P<0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P<0.05$,与 Db/Db 组比较。

2.2 MR409 改善糖尿病小鼠主动脉组织形态并减轻主动脉肥厚

小鼠主动脉行 HE 染色,结果显示:与 WT 组比较,Db/Db 组可见大量弹性纤维断裂,中膜增厚,细胞层数增多,细胞增大,形态改变,血管壁厚度增加 [(45.71±9.20) μm 比 (33.58±4.27) μm , $P<0.05$;

图 2];与 Db/Db 组比较,MR409 组小鼠主动脉可见大量连续完整的弹性纤维,血管壁厚度降低 [(36.57±8.15) μm 比 (45.71±9.20) μm , $P<0.05$; 图 2]。提示 MR409 明显改善糖尿病小鼠主动脉的形态结构,降低主动脉增厚。

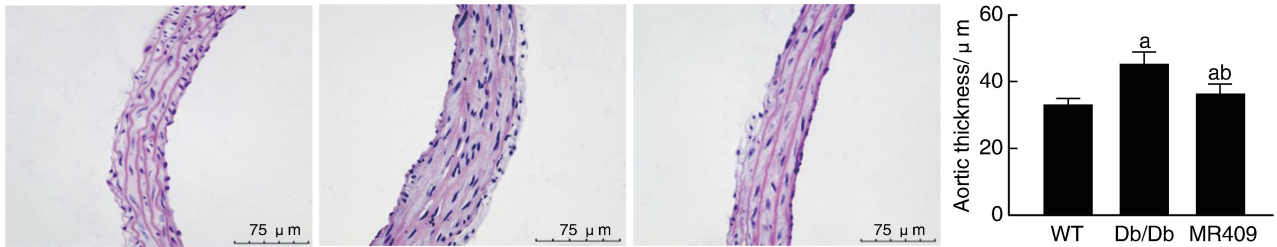


图 2. MR409 改善糖尿病小鼠主动脉血管形态并减轻主动脉增厚 ($n=8$)

HE 染色图,从左到右依次为 WT 组、Db/Db 组、MR409 组。a 为 $P<0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P<0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 2. MR409 improved aortic morphology and reduced aortic hypertrophy in diabetic mice ($n=8$)

2.3 MR409 减轻糖尿病小鼠主动脉钙盐沉积

通过 von Kossa 染色检测小鼠主动脉钙盐沉积,结果显示:WT 组主动脉各层结构完整,未见明显钙盐沉积;而在 Db/Db 组中,可见明显黑色钙盐沉积;与 Db/Db 组相比,MR409 组黑色钙盐沉积明显减少

($P<0.05$;图 3)。通过茜素红染色检测小鼠主动脉钙盐沉积,WT 组偶见散在橘红色钙盐沉积;而在 Db/Db 组中,可见明显橘红色钙盐沉积;与 Db/Db 组相比,MR409 组橘红色钙盐沉积明显减少 ($P<0.05$;图 4)。

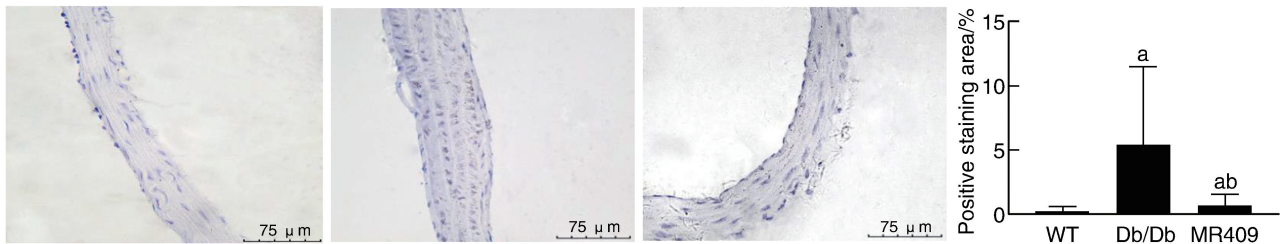


图 3. von Kossa 染色检测小鼠主动脉钙盐沉积 ($n=8$)

von Kossa 染色图,从左到右依次为 WT 组、Db/Db 组、MR409 组。a 为 $P<0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P<0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 3. Calcium salt deposition in mice aorta detected by von Kossa staining ($n=8$)

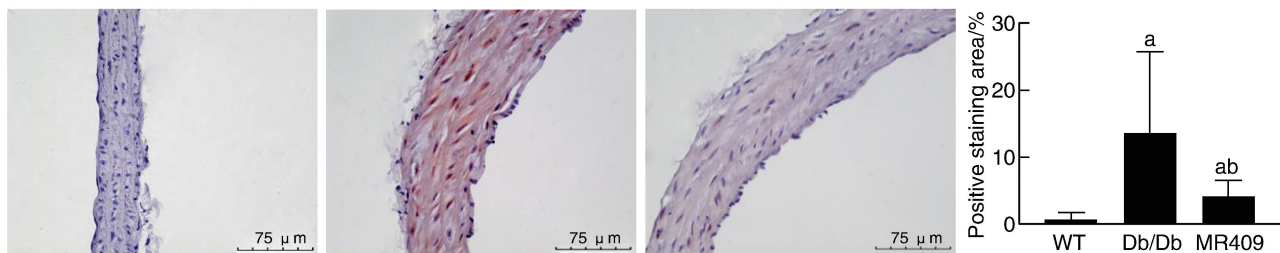


图 4. 茜素红染色检测小鼠主动脉钙盐沉积 ($n=8$)

茜素红染色图,从左到右依次为 WT 组、Db/Db 组、MR409 组。a 为 $P<0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P<0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 4. Calcium salt deposition in mice aorta detected by alizarin red staining ($n=8$)

2.4 MR409 改善糖尿病小鼠主动脉舒张功能

本实验通过离体血管灌流系统测定小鼠主动脉乙酰胆碱诱导的内皮依赖性血管舒张功能,结果发现,与 WT 组比较,Db/Db 组乙酰胆碱诱导的内皮依赖性血管舒张功能明显受损,而 MR409 组则可部分减轻其血管舒张功能受损($P < 0.05$;图 5)。

2.5 MR409 降低糖尿病小鼠主动脉 Runx2 表达

Runx2 是软骨细胞成熟和成骨细胞分化必不可少的关键因子^[14]。免疫组织化学染色显示,在 Db/Db 组中,Runx2 的表达(棕色区域及 MOD 值)较 WT 组增高;与 Db/Db 组相比,MR409 组 Runx2 的表达(棕色区域及 MOD 值)明显减弱($P < 0.05$;图 6)。

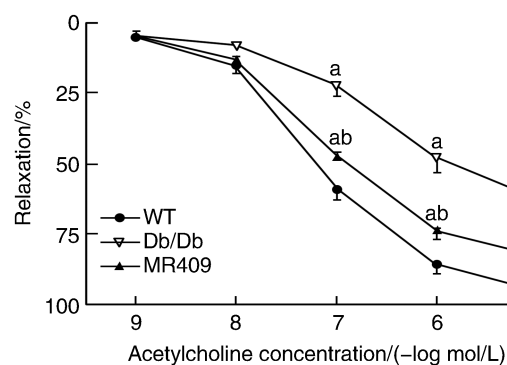


图 5. MR409 改善糖尿病小鼠主动脉舒张功能($n=8$)
a 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 5. MR409 improved aortic diastolic function in diabetic mice ($n=8$)

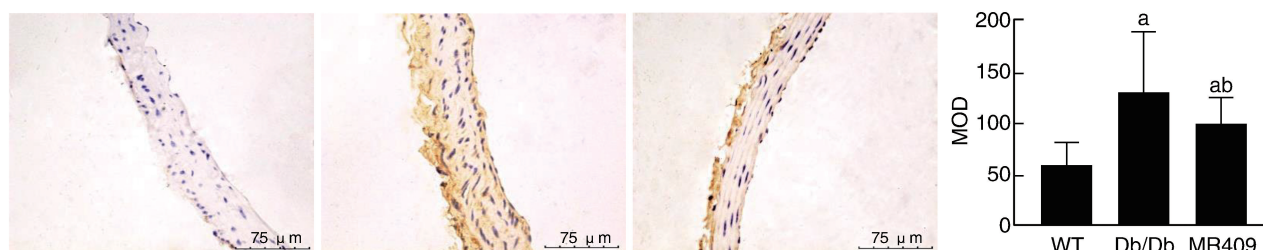


图 6. MR409 降低糖尿病小鼠主动脉 Runx2 表达($n=8$)

免疫组织化学染色图,从左到右依次为 WT 组、Db/Db 组、MR409 组。a 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 6. MR409 reduced Runx2 expression in aorta of diabetic mice ($n=8$)

2.6 MR409 降低糖尿病小鼠主动脉 ROS 水平

DHE 染色法测定小鼠主动脉 ROS 水平,结果显示,与 WT 组相比,Db/Db 组红色氧化荧光强度增强,ROS 含量显著增加;与 Db/Db 组相比,MR409

组红色氧化荧光强度下降,ROS 含量下降($P < 0.05$;图 7)。表明 MR409 治疗 Db/Db 糖尿病小鼠可降低 ROS 的产生。

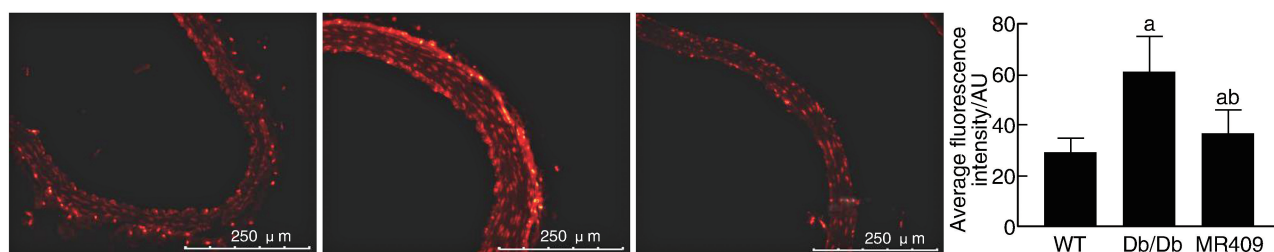


图 7. MR409 降低糖尿病小鼠主动脉 ROS 水平($n=8$)

DHE 染色图,从左到右依次为 WT 组、Db/Db 组、MR409 组。AU 表示平均荧光强度单位(arbitrary unit)。

a 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Db/Db 组比较。

Figure 7. MR409 reduces ROS level in aorta of diabetic mice ($n=8$)

3 讨论

血管钙化被认为是增加心脑血管疾病发病率和死亡率的一个独立危险因素^[15],也是预测脑卒

中^[16]和临床不良心血管事件发生的一个重要生物标示。目前临床上尚无治疗 VC 的有效药物。在本研究中,我们用基因缺陷小鼠 Db/Db 小鼠来构建 VC 模型,我们的结果显示 GHRHR-A MR409 治疗

可以减轻主动脉增厚,抑制 VC 并改善乙酰胆碱诱导的血管舒张功能。此外,MR409 还降低钙化相关蛋白 Runx2 的表达、血清 ALP 活性和主动脉 ROS 产生。

VC 常发生在糖尿病血管病变、动脉粥样硬化、慢性肾脏疾病以及衰老等,被认为是一种不可逆转的病理过程。目前可能用于治疗 VC 的一些药物或试剂包括用于治疗骨质疏松的药物^[17],如双磷酸盐、焦磷酸盐类似物等,以及对肾和心血管原发疾病的治疗药物。尽管这些药物在动物实验显示了一定的疗效,但尚未获得大规模的临床验证。

MR409 是诺贝尔生理学或医学奖得主 Andrew Schally 实验室合成的一种具有 GHRH 激动效应的生物多肽,由 29 个氨基酸组成,通过对 GHRH 活性部位和邻近结构的修饰,其生物活性和稳定性显著增加^[18]。外周组织和细胞包括心脏、血管细胞、各种干细胞、胰岛细胞^[19] 等可表达 GHRH 受体,MR409 通过直接与这些细胞表面上的 GHRH 受体结合而发挥生物作用。近年来的一些实验研究表明 GHRH 及其类似物对一些缺血性心脏病^[20] 以及 1、2 型糖尿病血管并发症具有良好的治疗效应^[21],其机制可能为促进干细胞增殖以及组织修复,或直接激动心脏、血管细胞表面 GHRH 受体偶联的 G 蛋白信号通路,后者激活环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 通路发挥心血管保护效应^[22]。因此,MR409 有望用来治疗一些难治性心血管疾病和代谢性疾病。最近的一个研究报道^[13],GHRH 类似物包括 MR409 可抑制成骨培养液诱导的血管平滑肌钙化。本实验采用两种钙化染色方法检测钙盐沉积,茜素红染色对少量的钙盐沉积比较敏感,而 von Kossa 染色则比较适用于有较大量钙盐沉积组织的染色。两种染色方法均显示 MR409 可以抑制糖尿病小鼠的 VC。

MR409 抑制 VC 的机制还不清楚。Shen 等^[13] 研究显示 GHRH 类似物激活 G 蛋白偶联的环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 通路,后者可抑制 NADPH 氧化酶来源的 ROS 和核因子 κ B 炎症信号通路;ROS 和炎症都已经被证实可以促进成骨基因的表达,从而促进钙化。有研究^[23] 表明,VC 与血管壁过多的 ROS 形成有关。本研究发现 MR409 治疗的糖尿病小鼠主动脉 ROS 生成减少,同时伴有 Runx2 蛋白表达降低及血 ALP 水平降低。Runx2 为成骨祖细胞增殖所必需的,能促进成骨细胞分化^[24-25]。Speer 等^[26] 研究证实,Runx2 对于高磷和氧化应激诱导的 VC

是必不可少的。Watanabe 等^[27] 的研究发现,慢性肾病和糖尿病主要通过氧化应激的增加来加速 VC,抗氧化疗法可以预防 VC 的进展。氧化应激和 ROS 在 VC 的发病机制中起重要作用^[28]。研究^[29] 发现活性氧的产生增强了血管平滑肌细胞向软骨细胞的转化。例如,在过氧化氢的存在下,钙化的增强与成骨标志物(包括 Runx2、骨钙素和 ALP)的表达增加以及收缩性血管平滑肌细胞表型标志物平滑肌蛋白 22 α 和 α 平滑肌肌动蛋白的表达减少相关。ROS 还可以激活内质网应激,导致转录因子 X 盒结合蛋白 1 的表达,后者与 Runx2 启动子结合,促进 Runx2 转录^[30],导致 VC。以上研究均表明 Runx2 在 VC 中具有关键作用,是血管平滑肌细胞向成骨细胞转化的标志蛋白,同时提示 ROS 是 Runx2 的上游调控因子,ROS 的减少可以抑制 Runx2 的表达,从而阻止 VC。GHRH 受体激动剂类似物降低 ROS 也在其他的几个心血管疾病模型中有报道^[31]。因此,我们认为 MR409 抑制糖尿病 VC 部分机制可能与抑制血管 ROS 产生从而降低糖尿病诱导的血管细胞成骨蛋白的表达有关,当然,这个假说需要进一步的研究进行证实。

本研究中,我们还观测到接受 MR409 治疗的糖尿病小鼠明显改善内皮依赖性血管舒张功能。血管内皮细胞功能障碍是预测心血管疾病发生的一个可靠指标,MR409 降低 ROS 以及降低血管钙盐沉积都可能与改善血管内皮细胞功能有关。

综上所述,本实验验证在给予基因缺陷小鼠 Db/Db 小鼠 MR409 治疗后,可以有效抑制其 VC,并改善内皮依赖性血管舒张功能,MR409 抗 VC 的机制可能部分与抑制血管细胞 ROS 产生和降低钙化相关蛋白 Runx2 表达有关。本实验结果为 VC 的预防和治疗,特别是糖尿病引起的 VC 的防治,提供了一个新的策略。

[参考文献]

- [1] 孙学娇,刘乃丰. 关注糖尿病与血管钙化的共同发病机制和临床意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(2): 169-174.
- [2] PROUDFOOT D, SHANAHAN C M. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media [J]. Herz, 2001, 26(4): 245-251.
- [3] 生杰,赵久阳. 慢性肾脏病患者的心血管钙化[J]. 中国血液净化, 2012, 11(1): 49-50.
- [4] MOON A R, PARK Y, CHANG J H, et al. Inverse regulation of serum osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand levels in patients with leg lesional vascular calcification: an observational study[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98

- (10): e14489.
- [5] 王倩, 马涛, 程治源, 等. 睾酮对维生素 D3 和尼古丁诱导的主动脉血管钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(2): 126-130.
- [6] JÖRG U, CUONG H V, BOGUSZ T, et al. Osteocalcin, osteopontin and RUNX2 expression in patients' leucocytes with arteriosclerosis[J]. *Diseases*, 2021, 9(1): 19.
- [7] 韦珍妮. 浅谈高磷血症致慢性肾脏病血管钙化的研究及治疗进展[J]. 临床检验杂志(电子版), 2020, 9(1): 241-242.
- [8] SCHALLY A V, WANG H, HE J, et al. Agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) inhibit human experimental cancers in vivo by down-regulating receptors for GHRH[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(47): 12028-12033.
- [9] GEMUNDO I, MIRAGOLI M, CARULLO P, et al. Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(45): 12033-12038.
- [10] ZHANG X, CUI T, HE J, et al. Beneficial effects of growth hormone-releasing hormone agonists on rat INS-1 cells and on streptozotocin-induced NOD/SCID mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(44): 13651-13656.
- [11] BAGNO L, SUNCION V Y, SCHALLY A V, et al. Growth hormone-releasing hormone agonists reduce myocardial infarct scar in swine with subacute ischemic cardiomyopathy[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(4): e001464.
- [12] THOUNAOJAM M C, POWELL F L, PATEL S, et al. Protective effects of agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in early experimental diabetic retinopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(50): 13248-13253.
- [13] SHEN J, ZHANG N, LIN Y N, et al. Regulation of vascular calcification by growth hormone-releasing hormone and its agonists[J]. *Circ Res*, 2018, 122(10): 1395-1408.
- [14] 陈澄, 覃春美, 欧三桃, 等. II 型糖尿病肾病大鼠肾动脉与肾内小动脉钙化及 BMP2 和 Runx2 的表达[J]. 西部医学, 2017, 29(2): 154-158.
- [15] GAO J, ZHANG K, CHEN J, et al. Roles of aldosterone in vascular calcification: an update[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 786: 186-193.
- [16] KAO H W, LIOU M, CHUNG H W, et al. Middle cerebral artery calcification: association with ischemic stroke[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(50): e2311.
- [17] 吴胜英, 董晓霞, 龚应霞, 等. 靶向骨硬化蛋白治疗骨质疏松与血管钙化: 一石二鸟或不可兼得[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36(2): 187-190.
- [18] IZDEBSKI J, PINSKI J, SCHALLY A V, et al. Synthesis and biological evaluation of superactive agonists of growth hormone-releasing hormone[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(11): 4872-4876.
- [19] KIARIS H, CHATZISTAMOU I, PAPAVALASSIOU A G, et al. Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(8): 311-317.
- [20] CLAUDIA P, FABIO S, FRANCESCA T, et al. GH-releasing hormone induces cardioprotection in isolated male rat heart via activation of RISK and SAFE pathways[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(4): 1624-1635.
- [21] ROMERO M J, LUCAS R, DOU H, et al. Role of growth hormone-releasing hormone in dyslipidemia associated with experimental type 1 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(7): 1895-1900.
- [22] FRIDLYAND L E, TAMARINA N A, SCHALLY A V, et al. Growth hormone-releasing hormone in diabetes[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7: 129.
- [23] BYON C H, HEATH J M, CHEN Y, et al. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: a focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells[J]. *Redox Biol*, 2016, 9: 244-253.
- [24] KOMORI T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 750-755.
- [25] ARUMUGAM B, VISHAL M, SHREYA S, et al. Parathyroid hormone-stimulation of RUNX2 during osteoblast differentiation via the regulation of lnc-SUPT3H-1; 16 (RUNX2-AS1; 32) and miR-6797-5p[J]. *Biochimie*, 2019, 158: 43-52.
- [26] SPEER M Y, LI X, HIREMATH P G, et al. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(4): 935-947.
- [27] WATANABE S, FUJII H, KONO K, et al. Influence of oxidative stress on vascular calcification in the setting of coexisting chronic kidney disease and diabetes mellitus[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20708.
- [28] GONG L, LIU Y, QIAN J, et al. Hydroxyapatite nanocrystals stimulate osteogenic differentiation in primary human aortic smooth muscle cells by activation of oxidative stress and the ERK pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(7): 7726-7733.
- [29] TÓTH A, BALOGH E, JENEY V. Regulation of vascular calcification by reactive oxygen species[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(10): 963.
- [30] LIBERMAN M, JOHNSON R C, HANDY D E, et al. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(3): 436-441.
- [31] CHAO C T, YEH H Y, TSAI Y T, et al. Natural and non-natural antioxidative compounds: potential candidates for treatment of vascular calcification[J]. *Cell Death Discov*, 2019, 5(1): 145.
- (此文编辑 曾学清)