

# 吡格列酮通过内质网应激致凋亡途径 对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响

马琦<sup>1</sup>, 边云飞<sup>2</sup>, 白瑞<sup>2</sup>, 鲁燕<sup>1</sup>, 肖传实<sup>1</sup>

(山西医科大学 1. 第一临床医学院心内科, 2. 第二临床医学院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 血管钙化; 内质网应激; 血管平滑肌细胞; 吡格列酮

[摘要] **目的** 探讨吡格列酮通过内质网应激致凋亡途径对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响及机制。**方法** 利用  $\beta$ -甘油磷酸钠联合丙酮酸钠制备钙化血管平滑肌细胞模型, 予不同浓度(10、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 吡格列酮干预。用 Von Kossa 染色、茜素红 S 染色测定钙含量以及碱性磷酸酶(ALP) 活性观察细胞钙化程度。采用流式细胞术及 Tunel 法检测细胞凋亡率, 实时荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测各组细胞 GRP78、Caspase-12 和 Runx2 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 钙化组其钙含量、ALP 活性较对照组细胞增多( $P < 0.05$ ), 而不同浓度吡格列酮呈剂量依赖性地减轻钙化大鼠血管平滑肌细胞的钙含量和 ALP 活性( $P < 0.05$ ); 钙化组其细胞凋亡率较对照组明显升高, 而不同浓度吡格列酮呈剂量依赖性地减轻钙化大鼠血管平滑肌细胞凋亡率( $P < 0.05$ ); 钙化组 GRP78、Caspase-12 和 Runx2 的 mRNA 及蛋白表达明显升高, 而不同浓度吡格列酮呈剂量依赖性地下调钙化大鼠血管平滑肌细胞 GRP78、Caspase-12 和 Runx2 的 mRNA 及蛋白表达( $P < 0.05$ )。**结论** 吡格列酮通过内质网应激致凋亡途径作用可减轻  $\beta$ -磷酸甘油诱导的血管平滑肌细胞钙化, 其作用可能与 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 表达下调有关。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

## Effect of Pioglitazone on Rat Vascular Smooth Muscle Cells Calcification by Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis

MA Qi<sup>1</sup>, BIAN Yun-Fei<sup>2</sup>, BAI Rui<sup>2</sup>, LU Yan<sup>1</sup>, and XIAO Chuan-Shi<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University; 2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Vascular Calcification; Endoplasmic Reticulum Stress; Vascular Smooth Muscle Cells; Pioglitazone

[ABSTRACT] **Aim** To explore the impact of pioglitazone on calcification of rat vascular smooth muscle cells in vitro through the pathway of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, and its signal transduction and molecular mechanisms. **Methods** Beta glycerin joint sodium pyruvate sodium phosphate was used to prepare calcified vascular smooth muscle cell model, with different concentrations (10, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) pyrazole ketone of wide intervention. Cell calcification was observed by using Von Kossa staining and alizarin red S staining, and calcium was determined by alkaline phosphatase (ALP) activity. Flow cytometry and Tunel method were used to detect apoptosis rate, real time fluorescence quantitative RT-PCR and Western Blot method were used to detect mRNA and protein expression of glucose regulated protein 78 (GRP78), cysteine-containing aspartate-specific proteases-12 (Caspase-12) and Runt-related transcription factor 2 (Runx2) in each group. **Results** The calcium content, ALP activity in calcification group increased compared with normal cells ( $P < 0.05$ ), and different concentrations of pioglitazone dose dependently reduced the calcium content and the activity of ALP in the calcification of vascular smooth muscle cells in rats ( $P < 0.05$ ); The apoptosis rate of calcification group was obviously higher than that in control group, and different concentration of pioglitazone dose dependently reduced

[收稿日期] 2013-12-07

[作者简介] 马琦, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 niujiamaqi@sina.com。边云飞, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

apoptosis rate of vascular smooth muscle cell ( $P < 0.05$ ); mRNA and protein expression of GRP78, caspase-12 and Runx2 increased significantly in calcification group, and different concentration of pioglitazone dose dependently downregulated mRNA and protein expression of GRP78, caspase-12 and Runx2 of vascular smooth muscle cell in rat ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Pioglitazone can reduce calcification of vascular smooth muscle cells induced by beta glycerol phosphate through the pathways of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, which effect may be related to GRP78, caspase-12 and Runx2 expression downgrade.

血管钙化(vascular calcification, VC)是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、血管损伤、慢性肾病和衰老等普遍存在的病理表现,主要表现为血管壁僵硬性增加,顺应性降低,进而导致心肌缺血、左心室肥大和心力衰竭,引发血栓形成,斑块破裂,是心脑血管疾病高发病率和高死亡率的重要因素之一,80%血管损伤和90%冠心病患者伴有血管钙化<sup>[1]</sup>。因此,如何减缓血管钙化的发病进程对心血管疾病的临床治疗,具有重要意义。新近研究表明凋亡在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)钙化过程中发挥了重要作用,可能与内质网应激介导的凋亡有关<sup>[2,3]</sup>。同时,吡格列酮(pioglitazone, PIO)是一类过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )配体,与罗格列酮相比,可显著减少心力衰竭恶化的发生率及泡沫细胞的形成作用<sup>[4]</sup>,但吡格列酮是否通过促进内质网应激所致的细胞凋亡来影响血管钙化的发生鲜有报道。本研究在体外VSMC钙化模型<sup>[5]</sup>基础上,探讨吡格列酮通过内质网应激致凋亡途径对血管钙化的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

SD大鼠由山西医科大学动物实验中心提供。吡格列酮(沈阳施德),GW9662(Sigma公司),DMEM高糖型培养基(Gibco),胎牛血清(杭州四季青公司),特异性小鼠抗大鼠 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白及DAB显色试剂盒(武汉博士德),钙离子定量检测试剂盒和碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),Tunel试剂盒(罗氏公司)及SP免疫组织化学试剂盒(北京博奥森),余为市售分析纯。

### 1.2 血管平滑肌细胞的培养及鉴定

采用无菌方法取160g左右Sprague-Dawley雄性大鼠胸主动脉中膜,将中膜剪成约1mm×1mm大小,贴培养皿底部,放入含20%胎牛血清的DMEM培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵箱中培养,用0.125%胰蛋白酶消化传代。实验选用第5~10

代细胞。经SM- $\alpha$ -actin免疫细胞化学染色确定为平滑肌细胞。

### 1.3 分组及处理

取上述平滑肌细胞生长至融合状态后,分别置于6孔板中进行实验。实验分6组:①对照组(加入10%DMEM细胞培养液);②钙化组[加入钙化培养基即在常规培养基中加入10mmol/L $\beta$ -甘油磷酸( $\beta$ -GP)和10mmol/L丙酮酸钠];③GW9662处理组[加入钙化培养基、25mmol/LGW9662(PPAR $\gamma$ 抑制剂)];④不同浓度PIO(10、50、100 $\mu$ mol/L)处理组[加入钙化培养基以及不同浓度吡格列酮(10、50、100 $\mu$ mol/L)]。每组设3个复孔,细胞每隔两天换液1次,连续培养15天<sup>[4]</sup>。

### 1.4 血管平滑肌细胞钙化的染色鉴定

取1.5×0.5cm<sup>2</sup>的盖玻片数枚放入6孔板内,以1.2×10<sup>5</sup>接种密度进行细胞爬片。分别制作实验组和对照组的细胞爬片。取出盖玻片先用预冷4℃的PBS缓冲液洗涤2次,浸入冰丙酮中固定20min。(1)茜素红S染色将细胞玻片放入1%茜素红S溶液内染色30min,用0.2%醋酸溶液快速冲洗1次,滤纸吸干。系列酒精脱水,二甲苯固定、封片。显微镜下钙盐沉积处被染为橘红色。(2)Von Kossa染色:将细胞玻片放入5%硝酸银溶液避光孵育15min,紫外灯照射10min,洗涤后浸入1%硫代硫酸铵溶液1min,洗涤后碱性品红复染。显微镜下观察钙盐沉积处为黑色。

### 1.5 血管平滑肌细胞的钙含量测定

弃上层培养基,用PBS缓冲液冲洗细胞2次,加入适量0.6mol/L盐酸,37℃去钙化作用24h。采用钙离子定量检测试剂盒测定。剩余细胞用PBS洗3次,加入0.05mol/LNaOH/0.1%SDS细胞裂解液,30min后提取胞浆蛋白,用BCA法蛋白分析试剂盒测定总蛋白,钙含量用蛋白含量标准化。

### 1.6 血管平滑肌细胞的碱性磷酸酶活性测定

弃上层培养基,用PBS缓冲液冲洗细胞2次,加入适量含1%TritonX-100的生理盐水,置于4℃冰箱24h。用超声波处理25s后反复吹打,使细胞充分破裂(倒置显微镜下观察到细胞破碎、无完整的

细胞结构),离心后取上清用 ALP 检测试剂盒测定 ALP 活性。测量时提取胞浆蛋白并测定总蛋白含量,用其校正细胞层 ALP 活性。

### 1.7 流式细胞术检测 VSMC 凋亡率

各组细胞用 0.25% 胰酶(无 EDTA)消化,血清终止消化后转移至离心管,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 PBS 冲洗 2~3 次,弃上清,每管 500  $\mu$ L buffer 重悬,分别加入 AnnexinV-FITC,PI 染液各 5  $\mu$ L,避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。

### 1.8 TUNEL 法检测 VSMC 凋亡率

弃上层培养基,收集细胞,采用细胞凋亡原位检测试剂盒,即 TUNEL 法进行检测,之后用 DAPI 染液染色封片,荧光倒置显微镜下观察。TUNEL 阳性呈绿色荧光,DAPI 呈蓝色荧光。每个细胞爬片观察 4 个独立视野,计算每 100 个细胞的凋亡个数,计算凋亡率。

### 1.9 RT-PCR 测定 GRP-78、Caspase-12 和 Runx2 mRNA 的表达

应用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并用微量分光光度计检测其吸光度在 1.8~2.0 之间,其后取 5  $\mu$ L RNA 按照反转录试剂盒制备 cDNA 后,进行 PCR 扩增。扩增引物为:GRP78 上游 5'-gagcacaacatggctgaga-3',下游 5'-tggagatgttctctgttcg-3',扩增片长 238 bp;Caspase-12 上游 5'-cgcaacaacgccatctat-3',下游 5'-ccaaggtaacgccaggaat-3',扩增片长 203 bp;

Runx2 上游 5'-ttgattgcctctgacacagc-3',下游 5'-ccca-cagttctgtgtct-3',扩增片长 202 bp; $\beta$ -actin 上游 5'-gtcaggctcatcactatcggaat-3',下游 5'-agaggtctttacggatg-caacgt-3',扩增片长 184 bp。

### 1.10 Western Blot 检测

收集细胞,提取总蛋白,取各样本蛋白 50  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭后分别加入一抗孵育;洗膜后加入 HRP 标记的二抗孵育,充分洗涤后加入增强发光剂,即刻与底片曝光,洗片后扫描电泳条带并进行光密度分析。

### 1.11 统计学处理

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,组间比较采用单方差分析,多重比较采用 LSD 法。

## 2 结果

### 2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置显微镜下观察,可见原代平滑肌细胞从组织块边缘游出(图 1A),VSMC 呈梭型,逐渐呈现束状排列,出现典型的“峰谷”样生长(图 1B)。经特异性免疫组织化学 SM- $\alpha$ -actin 染色,可见胞浆内 SM- $\alpha$ -actin 表达丰富,细丝状排列,符合 VSMC 特征(图 1C)。



图 1. 原代培养的大鼠 VSMC (A 和 B) 及 SM- $\alpha$ -actin 免疫细胞化学染色鉴定 (C) ( $\times 200$ )

Figure 1. Primary cultures of rat VSMC (A and B) and SM  $\alpha$ -actin immunocytochemical staining (C)

### 2.2 钙化的血管平滑肌细胞鉴定

倒置显微镜下观察,可见 VSMC 透明度下降,表现为多层生长状态,部分细胞死亡。与对照组相比,钙化组茜素红 S 染色可见橘红色区域,散装分布,证实有钙盐沉积;Von Kassa 染色时,与对照组比较,钙化组可见黑色沉积区域,证实有钙盐沉积(图 2)。

### 2.3 血管平滑肌细胞的钙含量及 ALP 活性分析

与对照组相比,钙化组钙含量( $P < 0.01$ )及

ALP 活性( $P < 0.01$ )明显增高,说明 VSMC 钙化模型复制成功。与钙化组相比,不同浓度 PIO 处理组其钙含量( $P < 0.05$ )及 ALP 活性( $P < 0.05$ )明显降低,说明吡格列酮可部分逆转  $\beta$ -磷酸甘油诱导的 VSMC 的钙化。且吡格列酮呈剂量依赖性地减少其钙含量及减轻 ALP 活性。与钙化组相比,GW6992 处理组钙含量( $P < 0.05$ )及 ALP 活性( $P < 0.05$ )升高,说明使用 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW6992 可促进 VSMC 钙化(表 1)。

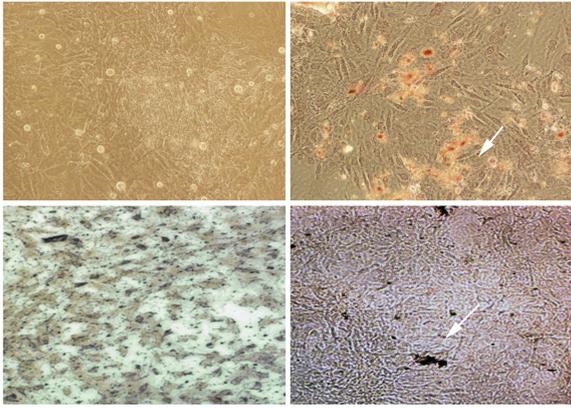


图 2. 血管平滑肌细胞钙化的茜素红 S 染色(上图)及 Von Kossa 染色(下图)鉴定( $\times 200$ ) 左为对照组,右为钙化组。  
Figure 2. The calcification of vascular smooth muscle cells with alizarin red S staining and Von Kossa staining identification( $\times 200$ )

表 1. 各组细胞钙沉积含量、ALP 活性比较( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

分组	钙含量(mmol/g)	ALP 活性(kU/g)
对照组	49.21 $\pm$ 2.40	49.05 $\pm$ 1.20
钙化组	161.33 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	370.01 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>
10 $\mu$ mol/L PIO 处理组	148.00 $\pm$ 2.50 <sup>ab</sup>	261.13 $\pm$ 3.20 <sup>ab</sup>
50 $\mu$ mol/L PIO 处理组	138.29 $\pm$ 6.00 <sup>ab</sup>	221.69 $\pm$ 1.69 <sup>ab</sup>
100 $\mu$ mol/L PIO 处理组	111.50 $\pm$ 1.70 <sup>ab</sup>	177.02 $\pm$ 3.00 <sup>ab</sup>
GW9662 处理组	185.31 $\pm$ 5.61 <sup>ab</sup>	412.05 $\pm$ 2.31 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

## 2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

采取 Annexin V-FITC/PI 对 VSMC 进行双标记染色,结果显示对照组细胞主要集中在 B3 区, B4 区

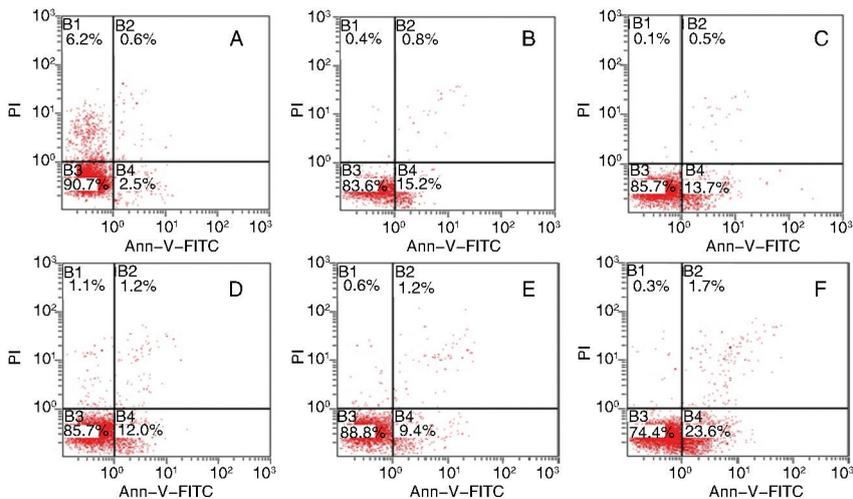


图 3. 流式细胞术检测细胞凋亡 A 为对照组, B 为钙化组, C 为 10  $\mu$ mol/L PIO 处理组, D 为 50  $\mu$ mol/L PIO 处理组, E 为 100  $\mu$ mol/L PIO 处理组, F 为 GW9662 处理组。

Figure 3. Detection of cell apoptosis by flow cytometry

和 B2 区内分布比较少;钙化组出现比较多的凋亡细胞,并有部分细胞出现坏死,相比较于对照组显著升高( $P < 0.01$ );不同浓度 PIO 处理组与钙化组相比, B4 区和 B2 区细胞分布明显减少,凋亡率显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GW9662 处理组凋亡率与钙化组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );图 3 和表 2)。

## 2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡率

倒置荧光显微镜下观察, TUNEL 阳性信号呈绿色荧光,所有的细胞核经 DAPI 荧光染料复染后,呈现蓝色荧光。结果显示,对照组仅见个别细胞凋亡;钙化组绿色荧光增多,提示凋亡的细胞增多;不同浓度 PIO 处理组细胞核绿色荧光较钙化组呈显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 GW9662 处理组,相比较于钙化组,绿色荧光明显增多,说明凋亡的细胞增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );图 4)。

表 2. 各组心肌细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

分组	凋亡率
对照组	3.35% $\pm$ 2.11%
钙化组	18.66% $\pm$ 2.09% <sup>a</sup>
10 $\mu$ mol/L PIO 处理组	17.39% $\pm$ 8.96% <sup>ab</sup>
50 $\mu$ mol/L PIO 处理组	13.39% $\pm$ 3.21% <sup>ab</sup>
100 $\mu$ mol/L PIO 处理组	10.12% $\pm$ 1.10% <sup>ab</sup>
GW9662 处理组	24.6% $\pm$ 5.20% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

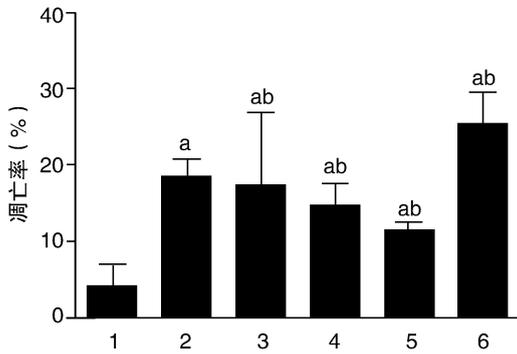


图 4. 各组血管平滑肌细胞凋亡率 1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为 10  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 4 为 50  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 5 为 100  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 6 为 GW9662 处理组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

Figure 4. Vascular smooth muscle cell apoptosis rate in different groups

## 2.6 GRP-78、Caspase-12 及 Runx2 的 mRNA 表达

与对照组比较, 钙化组和不同浓度 PIO 处理组 GRP-78、Caspase-12 及 Runx2 的 mRNA 表达增高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与钙化组比较, 不同浓度 PIO 处理组 GRP-78、Caspase-12 及 Runx2 的 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性, 提示吡格列酮可部分逆转 VSMC 钙化; GW9662 处理组 GRP-78、Caspase-12 及 Runx2 的 mRNA 表达较钙化组显著增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图 5)。

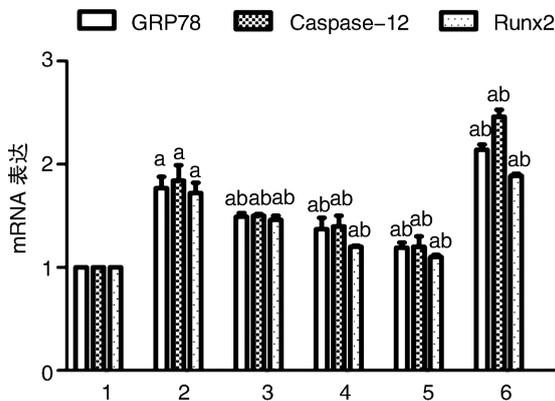


图 5. 各组血管平滑肌细胞 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 的 mRNA 表达 1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为 10  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 4 为 50  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 5 为 100  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 6 为 GW9662 处理组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组相比。

Figure 5. mRNA expression of GRP78, Caspase-12 and Runx2 in VSMC in different groups

## 2.7 Western Blot 法检测 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 的蛋白表达

与对照组比较, 钙化组和不同浓度 PIO 处理组

GRP78、Caspase-12 及 Runx2 蛋白表达增高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与钙化组比较, 不同浓度 PIO 处理组 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性; GW9662 处理组 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 蛋白表达较钙化组显著增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图 6)。

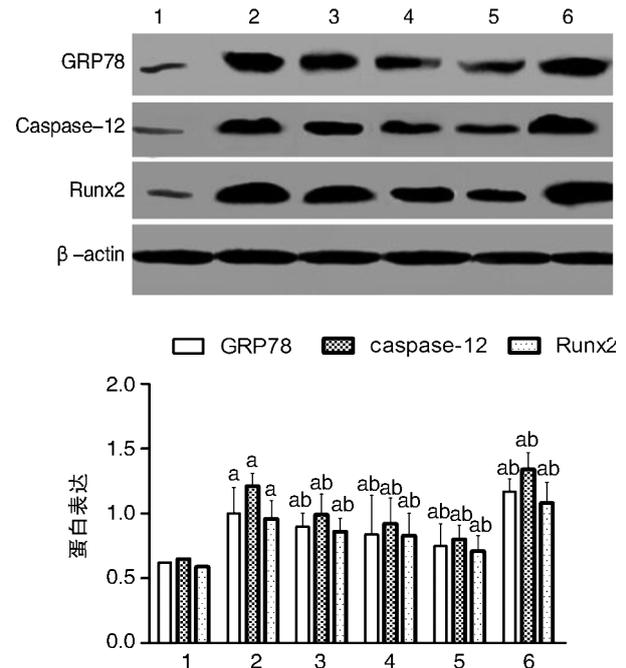


图 6. 各组血管平滑肌细胞 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 的蛋白表达 1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为 10  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 4 为 50  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 5 为 100  $\mu\text{mol/L}$  PIO 处理组, 6 为 GW9662 处理组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组相比。

Figure 6. Protein expression of GRP78, Caspase-12 and Runx2 in VSMC in different groups

## 3 讨论

血管钙化与冠心病、心肌梗死、脑卒中等多种疾病相关, 是发生心、脑血管急症的重要危险因素。以往认为血管钙化是钙盐在细胞内和细胞外基质的被动沉积, 近年来研究发现血管钙化是一种与骨发育类似的主动的、可调控的生物学过程, 类似于骨和软骨形成过程中的骨化, 主要特征是血管细胞尤其是 VSMC 成骨样表型转换<sup>[6]</sup>。随 VSMC 组织钙化的进展, 原有的细胞功能发生改变, 具备了骨细胞的特征和功能, 呈现出骨细胞特异性蛋白及基因表达<sup>[7,8]</sup>。

内质网应激是内质网内环境在外界环境影响下, 内质网折叠蛋白质发生未折叠或者异常蛋白蓄

积,导致“未折叠蛋白反应。”已有研究证实内质网应激参与细胞凋亡的过程,通过上调 GRP78 来发挥作用<sup>[9]</sup>,同时 GRP78 被公认为内质网应激的标志。Caspase-12 的激活是促发内质网凋亡的重要途径。Proudfoot 等<sup>[10]</sup>实验发现,人体 VSMC 在钙化发生前就出现细胞凋亡特征,其培养 1 周后出现来源于 VSMC 凋亡小体的基质囊泡(基质囊泡是正常软骨内骨钙化的生发中心);进而说明凋亡小体的功能类似骨基质囊泡,其能够蓄积钙,促进 VSMC 骨相分化。Lieberman 等<sup>[11]</sup>研究表明,使用骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)处理人冠状动脉平滑肌细胞,可诱导 GRP78 磷酸化 eIF1 $\alpha$  和转录因子 XBP1 表达增加,导致平滑肌细胞向成骨细胞表型转化,表明内质网应激可以通过增加 Runx2 表达促进冠状动脉平滑肌细胞钙化。本研究显示经  $\beta$ -磷酸甘油和丙酮酸钠诱导 VSMC 钙化,其凋亡率明显高于对照组,GRP78 及 Caspase-12 的表达也显著高于对照组,证实凋亡参与了 VSMC 的钙化过程,且与 GRP78 及 Caspase-12 表达上调有关,同时,Runx2 表达上调,表明 VSMC 向成骨样细胞表型转化。

吡格列酮是新型 PPAR $\gamma$  配体,能有效改善 2 型糖尿病的胰岛素抵抗,同时,也能改善体内脂质代谢及抗动脉粥样硬化。有研究指出<sup>[12]</sup>,PPAR $\gamma$  可以直接与 Smad3 发生作用,抑制由 TGF- $\beta$  诱导的 CTGF 合成,并通过抑制 VSMC 的增殖和迁移,发挥其抑制动脉粥样硬化的效应。Zhou 等<sup>[13]</sup>用高糖诱导 VSMC 钙化,并使用罗格列酮给予干预,结果表明罗格列酮可抑制 BMP 的表达,进一步抑制 VSMC 向成骨细胞表型转化。本研究中,GW9662 是 PPAR $\gamma$  抑制剂,可明显抑制吡格列酮对血管钙化的保护作用,而吡格列酮可部分逆转 VSMC 钙化;不同浓度吡格列酮处理组的细胞凋亡率明显下降,且在 100  $\mu\text{mol/L}$  时,对细胞凋亡抑制最明显,GRP78 及 Caspase-12 表达也相对减少,同时,Runx2 表达也下调明显。表明吡格列酮可抑制血钙平滑肌细胞凋亡,进一步抑制钙化,与 GRP78、Caspase-12 及 Runx2 表达下调有关。但吡格列酮并不能完全逆转 VSMC 钙化,说明在内质网应激致凋亡的钙化途径之外,尚有其它途径,还需进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Parhami F, Tintut Y, Patel JK, et al. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis[J]. Z Kardiol, 2001, 90: 27-30.

- [2] Masuda M, Ting DC, Levi M, et al. Activating transcription factor-4 regulate stearate-induced vascular calcification [J]. J Lipid Res, 2012, 53(8): 1 543-552.
- [3] Saito A, Ochioi K, Konodo S, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 ( $\alpha$ )-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2[J]. J Biol Chem, 2011, 286(6): 4 809-818.
- [4] 刘厂辉, 李建平, 阳辉. 罗格列酮对高脂血症大鼠平滑肌细胞凋亡的影响及机制探讨[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 199.
- [5] Bear M, Butcher M, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with beta -glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells [J]. Cell Biochem, 2008, 105(1): 185-193.
- [6] Sasaki T, Nakamura K, Sasada K, et al. Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2013, 227(1): 43-50.
- [7] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Azelnidipine inhibits mrx2-dependent osteogenic differentiation and matrix mineralization of vascular smooth muscle cells [J]. Int Heart J, 2012, 53(5): 331-335.
- [8] 王刚, 边云飞, 白瑞, 等. 肾素通过非血管紧张素 II 途径促进大鼠血管平滑肌细胞钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 294-298.
- [9] Xin W, Li X, Niu K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in a heart failure model induced by chronic myocardial ischemia [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(4): 503-509.
- [10] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification [J]. Z Kardiol, 2001, 90(3): 43-46.
- [11] Lieberman M, Johnson RC, Handy DE, 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): 411-436.
- [12] Fu M, Zhang J, Zhu X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(49): 45 888-894.
- [13] Zhou YB, Zhang J, Peng DQ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor C ligands retard cultured vascular smooth muscle cells calcification induced by high glucose [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 66: 421-429.

(此文编辑 许雪梅)