

内质网应激介导的凋亡在糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠内膜钙化中的作用

戴俏武¹, 徐绥宁², 王中群², 严金川², 刘乃丰³

(1. 江苏大学附属医院科教科, 江苏省镇江市 212001; 2. 江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001;

3. 东南大学附属中大医院心血管病研究所, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 内质网应激; 糖尿病; 动脉粥样硬化; 内膜钙化; 糖基化终产物; ApoE^{-/-}小鼠

[摘要] **目的** 观察内质网应激(ERS)介导的凋亡在糖尿病动脉粥样硬化(As)性载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠内膜钙化启动中的作用。**方法** 6 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠, 给予腹腔注射链脲佐菌素(STZ)40 mg/(kg·d), 连续 5 天。2 周后血糖水平 >3000 mg/L 的小鼠纳入本研究, 并由普通饮食转为半合成型高脂饮食(HFD), 同时给予尾静脉注射羧甲基赖氨酸(CML)10 mg/(kg·d), 连续 4 个月。在转换高脂饮食和给予 CML 注射后的 0 个月(0 月组, $n=10$)、2 个月(2 月组, $n=10$)和 4 个月(4 月组, $n=10$)时对小鼠实施安乐死, 进行相关检测与分析。**结果** 病理形态学研究证实 STZ-CML-HFD 联合处理 2 个月后, 糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠可形成早期的 As 斑块, 4 个月后形成典型的晚期 As 内膜钙化。主动脉壁平滑肌细胞固有表型 SM22 α 逐渐丢失, 而成骨表型骨形成蛋白 2、核心结合因子 $\alpha 1$ 、碱性磷酸酶的表达与活性则增加。主动脉壁 CML 沉积信号和糖基化终产物受体(RAGE)表达主要局限于粥样斑块内。Western blot 检测显示, 随着糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠病程的延长, 主动脉壁 CML、RAGE、CD36 表达显著上调, 而胆固醇外流调控三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 先出现代偿性增加继而又减少至基线附近。TUNEL 染色与 Cleaved Caspase-3 免疫组织化学染色发现, 随着糖尿病 As 的演进, 斑块内细胞凋亡率明显增加。定位分析显示 ERS 伴侣分子葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、C/EPB 同源蛋白 (CHOP) 主要分布在 As 病变区的脂质池内, 而且相对于 CHOP, 4 月组 GRP78 的分布位置似乎更倾向于脂质池的基底部。Western blot 半定量分析发现, ERS 相关指标 GRP78、磷酸化蛋白激酶样内质网激酶、磷酸化 eIF2 α 、活化转录因子 4 和 CHOP 的表达随着动物实验时间的延长均呈上调趋势。**结论** STZ-CML-HFD 联合干预 4 个月可成功诱导 ApoE^{-/-}小鼠形成糖尿病 As 钙化。CML/RAGE 可能首先启动了斑块 ERS 介导的凋亡, 继而诱发了钙化级联信号。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Intimal Calcification of Diabetic ApoE^{-/-} Mice

DAI Qiao-Wu¹, XU Sui-Ning², WANG Zhong-Qun², YAN Jin-Chuan², and LIU Nai-Feng³

(1. Department of Science and Education, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China; 3. Institute of Cardiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] Endoplasmic Reticulum Stress; Diabetes Mellitus; Atherosclerosis; Intimal Calcification; Advanced Glycosylation End Product; ApoE^{-/-} Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of endoplasmic reticulum stress (ERS)-mediated apoptosis in atherosclerotic calcification of diabetic apolipoprotein E gene knocked-out (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** 6 weeks old male ApoE^{-/-} mice were first rendered diabetic by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) for 5 days [40 mg/(kg·

[收稿日期] 2015-03-11

[修回日期] 2015-04-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81370408、81370409、81170254); 江苏省自然科学基金(BK20131246); 江苏省卫生厅课题(Q201308); 镇江市社会发展项目(SH2013024); 镇江市心血管病学重点实验室基金(SS2012002)

[作者简介] 戴俏武, 副研究员, 主要研究方向为临床科研与教学的管理, E-mail 为 602829655@qq.com。王中群, 博士, 主治医师, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 wangtsmc@aliyun.com。通讯作者刘乃丰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病合并动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 liunf@seu.edu.cn。

d)]. After 2 weeks, the blood glucose level >3000 mg/L mice were included in this study, and then were given a semi-synthetic high-fat diet (HFD), plus daily tail vein injection of carboxy methyl lysine (CML) [10 mg/(kg · d)]. The mice were euthanized at 0 month (group 0M, $n = 10$), 2 months (group 2M, $n = 10$), and 4 months (group 4M, $n = 10$) after the triple administration of STZ-CML-HFD. Related detection and analysis were carried out for each group of mice.

Results Morphological analysis showed that early atherosclerotic plaques appeared at 2 months after the triple administrations of STZ-CML-HFD, and that typically advanced plaques with extensive calcification lesions, abundant cholesterol crystals, and proliferative collagen were formed at 4 months after the triple administrations of STZ-CML-HFD. The intrinsic phenotype (SM22 α) of aortic smooth muscle cells was gradually lost, and osteoblast-like phenotypes (bone morphogenetic protein-2, core binding factor $\alpha 1$, alkaline phosphatase) were increased. CML deposition signal and the expression of receptor for advanced glycosylation end product (RAGE) in the aortic wall were mainly restricted in the atherosclerotic plaques. Western blot assay showed the expressions of CML, RAGE and CD36 in aortic wall of diabetic ApoE $^{-/-}$ mice were significantly up-regulated, but the expression of ATP binding cassette transporter A1 firstly displayed a compensated increase and then reduced near the baseline. Experiment of TUNEL staining and cleaved caspase-3 immunohistochemical staining found intra-plaque cells apoptotic rate rised with the progression of diabetic atherosclerosis. Immunohistochemical location analysis showed glucose regulated protein 78 (GRP78), a molecular chaperone of ERS and C/EPB homologous protein (CHOP) were mainly restricted in the lipid poor of atherosclerosis. Furthermore, compared with CHOP, the distribution signal of GRP78 in group 4M appeared more basal in lipid pool. Western blot semi-quantitative analysis found that the related indexes of ERS (GRP78, phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, phosphorylated eIF2 α , activating transcription factor 4, CHOP) were up-regulated with the extension of diabetic course in ApoE $^{-/-}$ mice. **Conclusions** STZ-CML-HFD combined intervention for 4 months can induce atherosclerotic calcification of diabetes in ApoE $^{-/-}$ mice. CML/RAGE may firstly start-up ERS-mediated apoptosis, and then cause to happen the calcification cascade signal.

血管钙化是糖尿病、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、慢性肾病等多种病理状态下,羟基磷灰石结晶[Ca₁₀(OH)₂(PO₄)₆]主动沉积在血管壁的病理过程,是多种病理性钙化发生的关键所在^[1-2]。已有研究显示凋亡泡沫细胞可为晚期斑块钙化提供成核微环境,进而促进血管钙化的形成与发展^[3]。细胞凋亡的主要通路除了死亡受体活化介导凋亡(外源性途径)与线粒体损伤介导凋亡(内源性途径)外,近年发现内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)启动的凋亡通路在糖尿病及其血管并发症中发挥着越来越大的作用,甚至有学者认为糖尿病本身就是一个ERS性疾病。为此,本研究拟以糖尿病As性载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE $^{-/-}$)小鼠为钙化研究载体,观察ERS介导的凋亡在钙化启动中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型制备

雄性 ApoE $^{-/-}$ 小鼠(江苏大学实验动物中心 SPF 级小鼠房饲养),6 周龄时,给予腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),溶于 pH 4.5、0.05 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液中,40 mg/(kg · d),连续 5 天。2 周后血糖水平 >3000 mg/L 的小鼠纳入本研

究,并由普通饮食转为半合成型高脂饮食(high-fat diet, HFD)(21% 脂肪,0.15% 胆固醇,其他成分同普通饮食),同时给予尾静脉注射糖基化终产物(advanced glycosylation end product, AGE)羧甲基赖氨酸(carboxy methyl lysine, CML),溶于生理盐水,10 mg/(kg · d),连续 4 个月。在转换高脂饮食和给予 CML 注射后的 0 个月(0 月组, $n = 10$)、2 个月(2 月组, $n = 10$)和 4 个月(4 月组, $n = 10$)时对小鼠实施安乐死,进行相关分析与检测。

1.2 形态学检测

分离小鼠主动脉,PBS 灌洗后一部分用于提取蛋白作 Western blot 检测,一部分用于检测钙含量和碱性磷酸酶活性,一部分用 10% 中性缓冲福尔马林固定制作蜡块。对石蜡切片分别行 HE 染色、Masson 染色、TUNEL 染色、Von Kossa 染色、免疫组织化学染色。

(1)HE 染色:石蜡切片经脱蜡、水化、染色、封片后显微镜下拍照分析。(2)Masson 染色:石蜡切片脱蜡至水、铬化、水洗、苏木精液染核、盐酸酒精分化、流水蓝化、丽春红酸性品红液染色、1% 磷钼酸水溶液分化、苯胺蓝染色、95% 酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树脂封片。结果判定:胶原纤维、粘液呈蓝色,肌纤维、细胞浆呈红色,胞核呈蓝黑色。应用图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 测定阳性染色总面积(蓝色)、血管面积,计算出每个视野主动脉

血管壁胶原含量。(3)TUNEL 染色:预处理好的样本 PBS 漂洗后行 TdT 酶反应,链霉亲和素-辣根过氧化物酶 37℃ 湿润避光反应 30 min,联苯二胺工作液室温显色反应 10 min,PBS 漂洗 3 次,苏木素常规染液复染,光学显微镜下观察、拍照。(4) Von Kossa 染色:切片脱蜡至水化,5% 硝酸银溶液中强烈日光直射 30 min,5% 硫代硫酸钠溶液中 1 min,1% 伊红溶液复染约数秒钟,脱水、封片。钙沉积处呈黑色,胞浆呈红色。(5)免疫组织化学染色:脱蜡至水,灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原,5% 牛血清白蛋白封闭,加 1:50 稀释的一抗,37℃ 1 h 或 4℃ 过夜,加聚合辣根过氧化物酶标记的 IgG,37℃ 20 min,联苯二胺显色,苏木素复染 5 min,1% 盐酸水溶液分化数秒钟,流水冲洗 1 h 以上,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜观察。

1.3 钙含量测定

取小鼠主动脉组织约 10 mg,于 55℃ 彻底烘干,在 37℃、0.6 mmol/L 稀盐酸中脱钙 24 h。盐酸悬液中钙含量用邻甲酚酞络合酮法测定。脱钙后的组织以二喹啉甲酸法测定蛋白含量,并以蛋白含量标准化钙化量。

1.4 碱性磷酸酶活性测定

小鼠主动脉组织剪碎匀浆后加裂解液,超声粉碎 10 s。按试剂盒说明书操作,加入缓冲液,37℃ 孵育 30 min。NaOH 终止反应,比色法测定 405 nm 下的吸光度值。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性用 p-硝基苯酚产生量计算并以蛋白含量标化,1 单位表示 30 min 内产生 1 nmol/L 硝基苯酚的活性。

1.5 Western blot 检测

提取经过处理的细胞总蛋白,二喹啉甲酸法定

量,煮沸变性,8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移(100 mA、2 h)至二氟化树脂膜上。5% 脱脂牛奶 4℃ 摇床孵育过夜,按 1:500 ~ 1:200 比例加入一抗,于 4℃ 孵育 4 h,TBST 洗涤 3 次,每 5 min 换液 1 次;按 1:1000 比例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,显示于 X 线片上。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 统计学方法

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,所有数据用 SPSS 11.0 软件分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ApoE^{-/-} 小鼠血糖血脂的动态变化

给予 ApoE^{-/-} 小鼠 STZ 40 mg/(kg · d) 连续 5 天腹腔注射后,小鼠血糖显著升高,超过 3000 mg/L,亦即糖尿病造模成功。在给予 HFD 饲喂和 CML 尾静脉注射 2、4 个月后,与 0 月组相比,血糖、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯均有显著上升,但 4 个月、2 个月的血糖水平无显著性差异,均在高糖区间波动。高密度脂蛋白胆固醇在转换饮食与 CML 尾静脉注射 2 个月 after 无显著性变化,但到 4 个月 after 出现显著性降低(表 1)。上述结果提示,STZ-CML-HFD 联合处理后 2 个月即形成高糖高脂血症,4 个月小鼠胆固醇逆向转运受到严重削弱。

表 1. 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 STZ-CML-HFD 联合处理后 0、2、4 个月后血糖和血脂水平(*n* = 10, mg/L)
Table 1. Plasma glucose and lipid levels in diabetic ApoE^{-/-} mice at 0, 2 and 4 months after the triple administration of STZ-CML-HFD(*n* = 10, mg/L)

分 组	血糖	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白胆固醇	高密度脂蛋白胆固醇
0 月组	3921 ± 217	2512 ± 169	435 ± 72	2066 ± 181	345 ± 31
2 月组	4378 ± 309 ^a	5793 ± 458 ^a	587 ± 51 ^a	5208 ± 391 ^a	292 ± 17
4 月组	4205 ± 156 ^a	9178 ± 721 ^{ab}	715 ± 86 ^{ab}	8685 ± 684 ^{ab}	175 ± 21 ^{ab}

a 为 *P* < 0.05,与 0 月组相比;b 为 *P* < 0.05,与 2 月组相比。

2.2 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉壁形态学改变及钙沉积动态观察

HE 染色和 Von Kossa 染色形态学研究证实,STZ-CML-HFD 处理 ApoE^{-/-} 小鼠 2 个月 after 在主动脉壁即形成早期 As 斑块,但无显著钙盐沉积,亦无内弹力板破坏;处理 4 个月 after 形成典型的晚期 As 斑

块:大的脂质池中富含针菱形的胆固醇结晶,内弹力板完整性被破坏,胶原纤维明显增多,在中膜及内膜出现广泛点灶状黑色钙沉积(图 1)。定量结果显示主动脉壁胶原含量 4 月组比 2 月组增加 1.36 倍;邻甲酚酞络合酮法钙定量显示 4 月组主动脉壁钙盐含量比 2 月组增加 2.37 倍,但 2 月组、0 月组

钙盐含量无显著性差异(图2)。上述结果提示 STZ-CML-HFD 联合处理 ApoE^{-/-} 小鼠 4 个月可成功诱导出糖尿病 As 钙化模型。

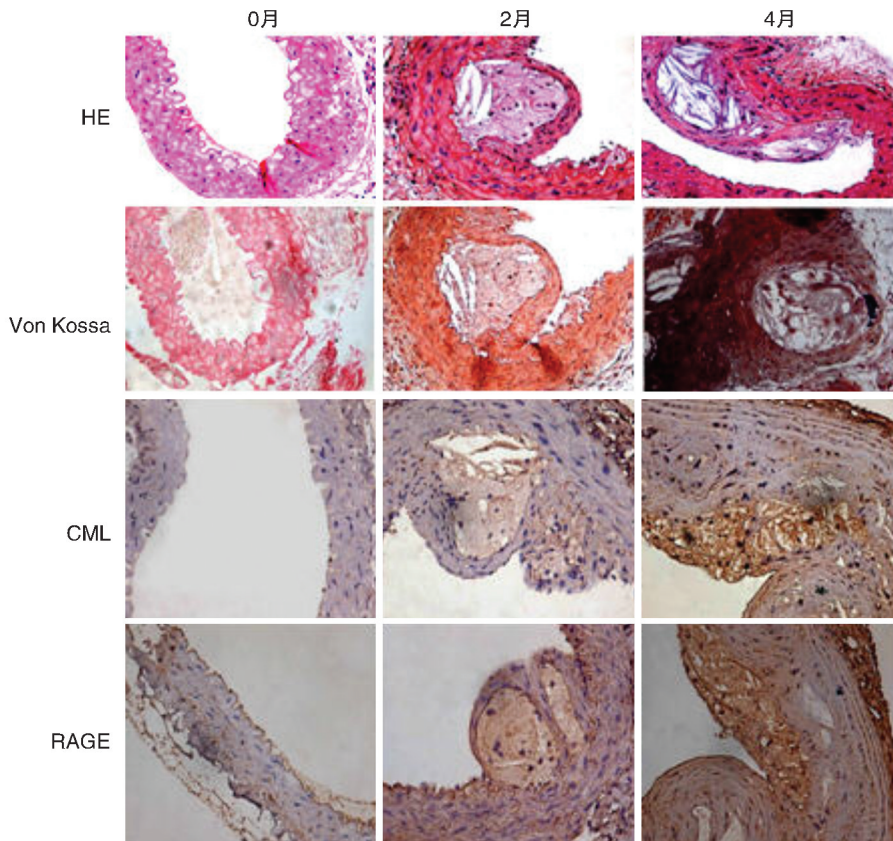


图 1. 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 STZ-CML-HFD 联合处理 0、2、4 个月后斑块内钙化的病理形态学变化 (200 ×) HE 染色可见联合处理 2 个月即形成典型的 As 斑块, Von Kossa 染色中的黑色颗粒为钙化阳性区, CML 和糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycosylation end product, RAGE) 的免疫组织化学染色中棕黄色颗粒为 CML 和 RAGE 的表达阳性区。

Figure 1. Progression of atherosclerotic calcification in diabetic ApoE^{-/-} mice at 0, 2, and 4 months after the triple administration of STZ-CML-HFD (200 ×)

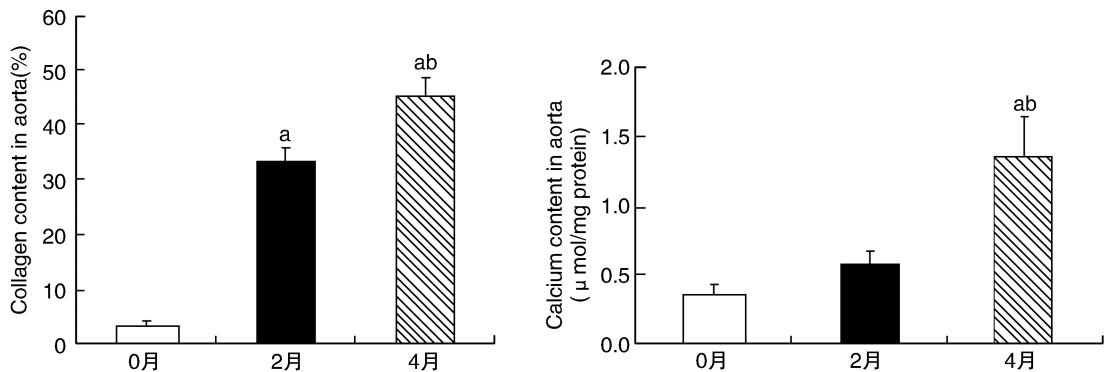


图 2. 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 STZ-CML-HFD 联合处理 0、2、4 个月后主动脉壁胶原纤维及钙盐沉积的定量分析 左图为 Masson 染色后主动脉壁胶原纤维的定量分析; 右图为邻甲酚酞络合酮法测定主动脉壁钙盐沉积的定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与 0 月组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 2 月组相比。

Figure 2. Digital quantification of the percentage of aortic collagen by Masson staining and calcium content in aorta by O-cresolphthalein complexone method in diabetic ApoE^{-/-} mice at 0, 2, and 4 months after the triple administration of STZ-CML-HFD

2.3 ApoE^{-/-}小鼠主动脉壁 CML 及钙化相关指标的动态变化

免疫组织化学染色显示,糖基化终产物 CML 蓄积信号主要分布在 As 斑块区,并且只出现在 2 月组和 4 月组小鼠;AGE 的特异性受体 RAGE 在 3 组小鼠均出现表达(图 1)。Western blot 半定量分析显示,CML 蓄积、RAGE 表达 4 月组比 2 月组分别增加了 4.7 倍、1.5 倍(图 3),提示血管壁 CML 蓄积与 RAGE 活化随着糖尿病 As 的进展而加剧。Western blot 半定量分析还显示,随着实验时间的延长,主动脉壁骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor $\alpha 1$, Cbfa1)、ALP 表达呈现增加趋势,而 SM22 α 表达则呈下降趋势(图 3)。ALP 活性检测显示 4 月组小鼠主动脉壁 ALP 活性比 2 月组增加 2.8 倍,不过,2 月组、0 月组无显著性差异(图 3),这与主动脉壁钙盐沉积的变化相一致。上述结果提示 STZ 与 CML 的处理可能与血管壁平滑肌细胞的成骨样分化存在关联。

2.4 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 As 病变区细胞凋亡情况

免疫组织化学定性分析显示,活化的 Cleaved Caspase-3 蛋白在 3 组小鼠的主动脉壁均有表达,但斑块病变区的富集更明显(图 4A)。STZ-CML-HFD 联合处理 4 个月与 2 个月相比,糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠 As 病变区 TUNEL 阳性细胞增加了 1.71 倍(图 4B)。Western blot 半定量分析发现,在 0 月组、2 月组、4 月组间糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠主动脉壁 Cleaved Caspase-3 表达存在显著差别(图 3)。上述资料证

实主动脉病灶区的细胞凋亡会随着糖尿病 As 疾病的进展而增加。

2.5 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 As 病变区 ERS 相关指标的变化

免疫组织化学定位分析显示 ERS 伴侣分子葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)、C/EPB 同源蛋白(C/EPB homologous protein, CHOP)主要分布在 As 病变区的脂质池内,而且相对于 CHOP,4 月组 GRP78 的分布位置似乎更倾向于脂质池的基底部(图 4A)。Western blot 半定量分析发现 ERS 相关指标 GRP78、磷酸化蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、磷酸化 eIF2 α 、活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)和 CHOP 的表达随着动物实验时间的延长均呈上调趋势(图 4C),提示糖尿病 As 的发生与演进伴随了 ERS 的发生。进一步的研究证实调节胆固醇逆向转运的关键节点三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)在小鼠转变饮食和 CML 处理 2 个月后显著上调,而 4 个月后又基本恢复到基线水平,但胆固醇的摄取者 CD36 却一直呈上调趋势(图 4C)。结合血清学指标,STZ-CML-HFD 联合处理 2 个月可能导致了主动脉壁胆固醇的大量蓄积,从而引起 ABCA1 代偿性上调,促进胆固醇的逆向转运,但 4 个月后可能代偿失调,因此 ABCA1 又回落至基线水平。CD36 由于对胆固醇的摄取存在负反馈机制因而导致 CD36 一直上调表达。

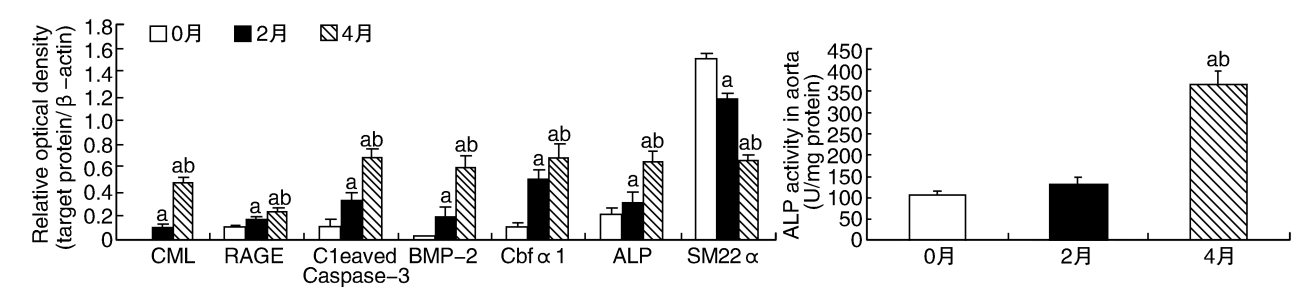


图 3. 糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠 STZ-CML-HFD 联合处理 0、2、4 个月后主动脉壁钙化相关指标的定量分析 左图为 CML、RAGE、Cleaved Caspase-3、BMP-2、Cbfa1、ALP、SM22 α 的 Western blot 半定量分析;右图为 ALP 活性的定量分析。a 为 $P < 0.05$,与 0 月组相比;b 为 $P < 0.05$,与 2 月组相比。

Figure 3. Quantitative analysis of relative calcification on aorta in diabetic ApoE^{-/-} mice at 0, 2, and 4 months after the triple administration of STZ-CML-HFD

3 讨论

糖基化终产物是一类异质性生物大分子,在

As、糖尿病、慢性肾病及其他多种疾病的发生发展中发挥了重要作用^[4]。机体内 AGE 池主要有内源性和外源性两大来源。外源性 AGE 来自日常饮食,

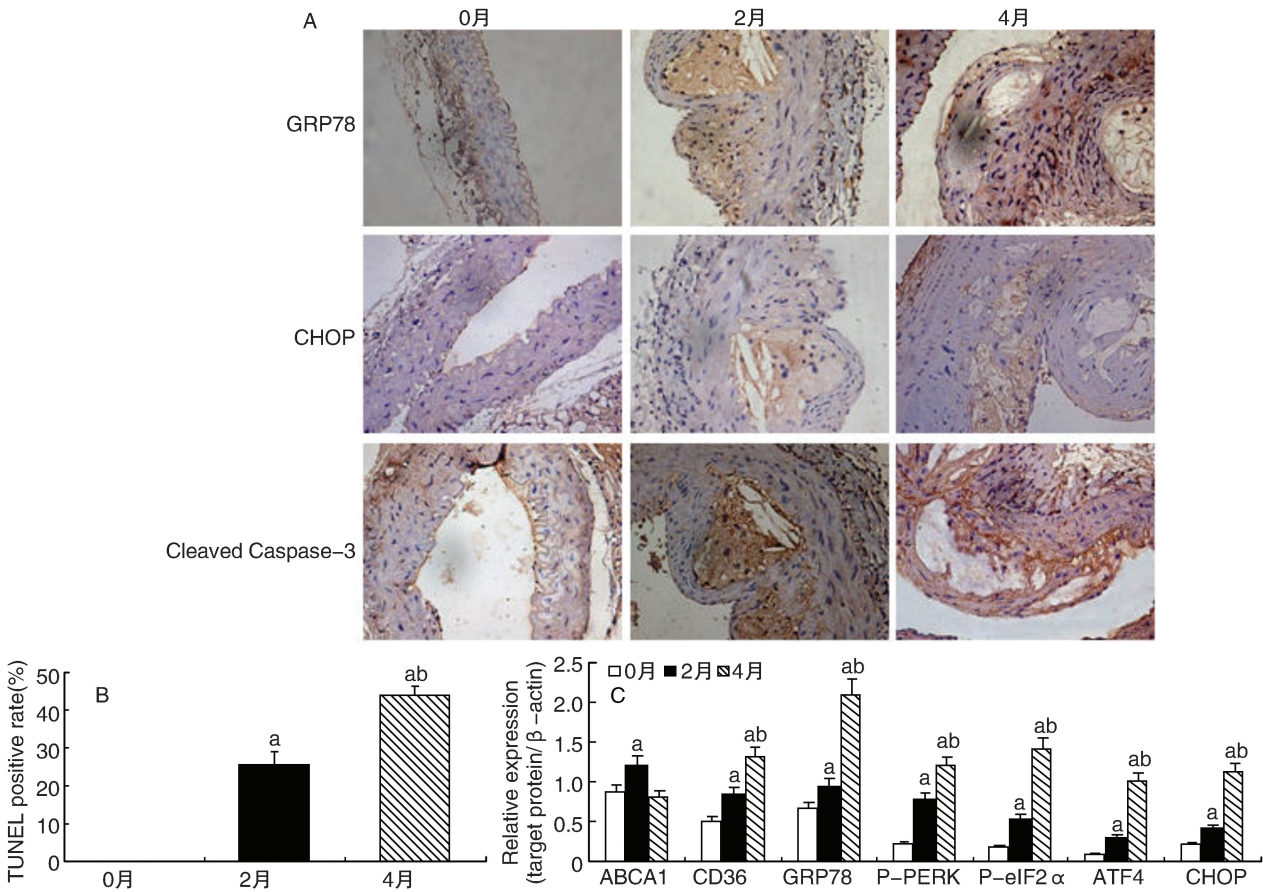


图 4. 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 STZ-CML-HFD 联合处理 0、2、4 个月后主动脉壁 ERS 凋亡通路相关指标的分析 A 图为 GRP78、CHOP、Cleaved Caspase-3 在主动脉壁的免疫组织化学染色图 (200 ×); B 图为斑块内 TUNEL 染色阳性率定量分析; C 图为 ABCA1、CD36、GRP78、P-PERK、P-eIF2 α 、ATF4、CHOP 的 Western blot 半定量检测。a 为 $P < 0.05$, 与 0 月组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 2 月组相比。

Figure 4. Analysis of relative indexes about endoplasmic reticulum stress-apoptosis on aorta in diabetic ApoE^{-/-} mice at 0, 2, and 4 months after the triple administration of STZ-CML-HFD

内源性 AGE 主要来自体内脂质、蛋白、核酸的非酶性糖基化,尤其是在糖尿病的高血糖状态下更易形成内源性的 AGE。目前,研究者已经阐明非交联非荧光性 CML 是在食品 AGE 分析、动物相关研究中应用最为广泛的一个标记物^[5-6]。

本研究采用 ApoE^{-/-} 小鼠腹腔注射 STZ 选择性的破坏胰岛 β 细胞,产生高糖血症并使之最终形成内源性 AGE,继而给予半合成型 HFD 并连续尾静脉注射外源性糖基化终产物 CML,以期通过内源性、外源性的 AGE 同时作用制备糖尿病 As 钙化模型。形态学分析证实,在给予 STZ-CML-HFD 两个月后即形成 As 早期斑块,但经典的晚期斑块出现在联合处理 4 个月后。免疫组织化学染色发现主动脉壁 CML 沉积信号主要出现在 As 斑块区。上述资料证实 STZ-CML-HFD 联合处理可成功诱导 ApoE^{-/-} 小鼠发生糖尿病 As 钙化,并且血管壁 CML 的蓄积与血管钙化可能存在某种关联。

本研究显示,随着糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠病程的演进,主动脉钙化标记物 BMP-2、Cbf α 1 和 ALP 的表达呈现增加趋势,结合主动脉平滑肌细胞固有表型 SM22 α 表达的减少,可见 STZ-CML-HFD 联合干预所诱导的 As 钙化至少部分是由于平滑肌细胞的成骨样分化引起的。

越来越多的证据显示凋亡在血管钙化过程中发挥了重要作用^[1-2,7-8]。Proudfoot 等^[8]的研究证实,用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制凋亡可减少结节内钙化 40% 左右,而促进凋亡则可增加 10 倍几率的钙化。我们的实验也发现随着疾病演进斑块内的凋亡细胞阳性率及活化的 Caspase-3 增加。

内质网在细胞内分布广泛,不仅是蛋白质折叠、运输以及细胞内 Ca²⁺ 储存的主要场所,同时也是胆固醇及其他许多脂质合成的场所^[9-10]。Kim 等^[11]研究显示,高血糖可能通过 ERS 活化糖原合成酶激酶 3 调控脂代谢关键基因的表达,导致脂代

谢紊乱,进而促进 As 发生发展。Duan 等^[7]研究显示 ERS 介导的凋亡可能参与了血管钙化的形成。由此可见,ERS 在血管壁损伤过程中发挥了举足轻重的作用。结合本研究相关结果,可以推测糖尿病状态下大量生成的 AGE 蓄积在血管壁,导致血管壁细胞内质网糖脂代谢紊乱,胆固醇逆向转运受损,继而出现 ERS 介导的泡沫细胞凋亡,钙化级联形成,最终导致难以逆转的钙盐沉积、钙化形成,斑块稳定性及血管壁顺应性发生变化,促进 As 的恶性演进。但要进一步阐述该机制,尚需体外细胞学水平的深入探讨。

[参考文献]

- [1] Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification [J]. Trends Cardiovasc Med, 2015, 25(4): 267-274.
- [2] 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.
- [3] Kurabayashi M. Bone metabolism and cardiovascular function update: Vascular calcification as a manifestation of bone-vascular axis [J]. Clin Calcium, 2014, 24(7): 11-19.
- [4] Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes [J]. Exp Gerontol, 2011, 46(4): 217-224.
- [5] Semba RD, Arab L, Sun K, et al. Fat mass is inversely

associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults [J]. J Nutr, 2011, 141(9): 1726-730.

- [6] Xu H, Wang Z, Wang Y, et al. Biodistribution and elimination study of fluorine-18 labeled Ne-carboxymethyl-lysine following intragastric and intravenous administration [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57897.
- [7] Duan X, Zhou Y, Teng X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(4): 694-699.
- [8] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies [J]. Circ Res, 2000, 87(11): 1055-062.
- [9] Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): 2792-797.
- [10] Rieusset J. Contribution of mitochondria and endoplasmic reticulum dysfunction in insulin resistance: Distinct or interrelated roles [J]? Diabetes Metab, 2015, pii: S1262-3636(15)00030-0. doi: 10.1016/j.diabet.2015.02.006.
- [11] Kim AJ, Shi Y, Austin RC, et al. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3 [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 1): 89-99.

(此文编辑 曾学清)