

儿茶酚抑素抑制血管钙化的作用及机制

樊小容¹, 谭小青¹, 张旭升¹, 黄战军¹, 蔡博治²

1. 深圳市龙岗区人民医院心血管内科, 广东 深圳 518172;

2. 汕头大学医学院第一附属医院分子心脏病学实验室, 广东 汕头 515041

【摘要】 目的 观察儿茶酚抑素(CST)对大鼠血管钙化的影响。方法 24只SD大鼠按随机数表法分为正常组、钙化组和钙化+CST组,每组8只。正常组大鼠在造模当天予生理盐水肌注和花生油灌胃处理,钙化组采用维生素D₃和尼古丁诱导大鼠血管钙化模型,钙化+CST组给予CST 2 nmol/(kg·d)腹腔内注射4周,检测血管钙盐沉积(Von Kossa染色);测定大鼠主动脉钙含量(钙离子测试盒)、碱性磷酸酶(ALP)活性(碱性磷酸酶试剂盒)、主动脉组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量(均为放射免疫法)。**结果** 维生素D₃和尼古丁能够建立典型大鼠血管钙化模型;与正常组大鼠比较,Von Kossa染色示钙化组主动脉有大量黑色颗粒沉淀,经CST干预后,主动脉组织钙盐沉积明显减少;与此同时,钙化组大鼠主动脉组织的钙离子含量及ALP活性明显升高,与正常组大鼠比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);经CST干预后,钙化+CST组大鼠的钙离子含量及ALP活性明显减轻,与钙化组大鼠比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);钙化组大鼠血清MCP-1和TNF-α浓度明显高于正常组大鼠,差异均有统计学意义($P<0.05$);经CST干预后,钙化+CST组大鼠的血清MCP-1和TNF-α浓度较钙化组大鼠明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 儿茶酚抑素可抑制大鼠血管钙化,可能与下调MCP-1和TNF-α表达有关。

【关键词】 儿茶酚抑素; 血管钙化; 炎症因子; 单核细胞趋化蛋白-1; 肿瘤坏死因子-α

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)05-0545-04

Effect and mechanism of catechin on vascular calcification in rat models. FAN Xiao-rong¹, TAN Xiao-qing¹, ZHANG Xu-sheng¹, HUANG Zhan-jun¹, CAI Bo-zhi². 1. Department of Cardiology, Longgang District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518172, Guangdong, CHINA; 2. Molecular Cardiology Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, CHINA

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of catechin on vascular calcification in rat models. **Methods** Twenty-four rats were randomly divided into normal, calcification, and calcification plus catechin groups (8 in each group). The normal group was treated with normal saline and peanut oil on the day of modeling, the calcification group was induced by vitamin D₃ plus nicotine, and the calcification plus catechin group was injected intraperitoneally with 2 nmol/(kg·d) catechin for 4 weeks. Vascular calcification was detected by Von Kossa staining. Calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity were determined by using calcium assay kit and alkaline phosphatase detection kit, respectively. The contents of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in serum were determined by radioimmunoassay. **Results** Rat models of vascular calcification were established by vitamin D₃ and nicotine. Compared with the normal group, Von Kossa staining in the calcification group showed mass black granule deposited in aorta, and the calcium content and ALP activity in calcified group were increased significantly ($P<0.05$). Meanwhile, in calcification group, the expression of MCP-1 and TNF-α in serum was up-regulated significantly than that in the normal group ($P<0.05$). The degree of calcification in calcification plus catechin group was improved significantly. In addition, the levels of MCP-1 and TNF-α in serum decreased significantly compared with the calcification group ($P<0.05$). **Conclusion** Catechin can improve vascular calcification in rats, which may be related to the down-regulation of MCP-1 and TNF-α expression.

【Key words】 Catechin; Vascular calcification; Inflammatory factors; Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); Tumor necrosis factor-α (TNF-α)

血管钙化为过量钙盐沉积于血管壁,是主动的、多因素调节的过程^[1],多种活性因子参与调控血管钙化的发生发展。血管钙化作为导致临床心血管事件的重要危险因素已成为共识,防治血管钙化显得特别重要,因此,寻求

新的活性因子不仅可作为血管钙化机制的重要补充,也为防治血管钙化提供新的策略。儿茶酚抑素(catestatin, CST)是由肾上腺嗜铬细胞产生的嗜铬颗粒蛋白A,由21个氨基酸组成的多肽结构,通过抑制交感肾上腺系统儿

基金项目:广东省深圳市龙岗区创新科研基金(编号:LGKCYLWS2018000171)

通讯作者:张旭升,E-mail:zxsheng80@163.com

茶酚胺的释放,可调节心血管系统作用如舒张血管、调节血压及心肌收缩力等^[2],然而对血管钙化的影响尚未见国内外学者报道,因此,本实验将探讨CST对大鼠血管钙化的作用以及可能相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和相关试剂来源 SD大鼠24只,雄性,8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。CST购自Tocris生物科技有限公司;维生素D₃由Sigma公司生产,尼古丁由Merck公司生产;钙离子测试盒和ALP试剂盒购自南京建成生物工程研究所;MCP-1试剂盒和TNF-α试剂盒购自北京华英生物研究所。

1.2 动物模型的制备与取材 按随机数表法将24只雄性SD大鼠分为正常组、钙化组和钙化+CST组,每组8只。正常组大鼠在造模当天予生理盐水肌注和花生油灌胃处理;钙化组大鼠在实验当天予维生素D₃(300 000 U/Kg在大腿肌肉注射1次),并用尼古丁灌胃(25 mg/kg,早晚各1次);钙化+CST组大鼠在造模后第二天开始用CST 2 nmol/(kg·d)腹腔内注射。然后三组大鼠常规饲养4周,麻醉后取材,分离主动脉组织,其中一部分组织多聚甲醛固定后制作蜡块,其余组织锡纸包裹并标记,-80℃储存。低温离心分离血清,-80℃保存。

1.3 Von Kossa染色 取大鼠胸主动脉做石蜡切

片,1%硝酸银溶液浸泡,紫外线照射后,5%硫代硫酸钠溶液浸泡,碱性品红染色。

1.4 ALP活性及钙离子含量测定 将大鼠主动脉组织剪碎并匀浆后,取上清检测,用甲基百里香酚蓝比色法检测钙离子含量,用磷酸苯二钠法检测ALP活性,详细步骤见试剂盒说明书。

1.5 血清单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量测定 采用放射免疫法检测大鼠血清MCP-1和TNF-α含量,具体步骤详见试剂盒说明书。

1.6 统计学方法 应用Graph Pad Prism 4统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用q检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠的血管钙化指标比较 与正常组大鼠比较,钙化组大鼠主动脉中膜可见较多黑色颗粒表达(Von Kossa染色),提示钙盐沉积明显,用CST干预后,主动脉组织钙盐沉积明显减少,见图1。与此同时,钙化组大鼠主动脉组织的钙离子含量及ALP活性明显升高,与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);经CST干预后,钙化+CST组大鼠的钙离子含量及ALP活性较钙化组明显减轻,与钙化组大鼠比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

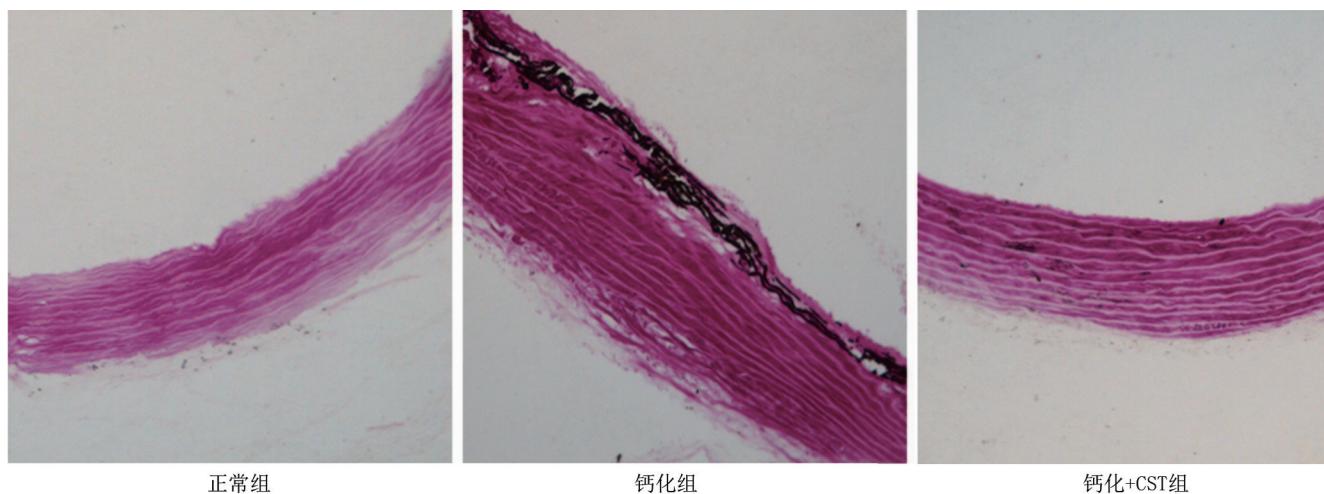


图1 大鼠主动脉Von Kossa染色,黑色颗粒为钙盐沉积($\times 100$)

表1 三组大鼠主动脉组织钙含量与ALP活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	钙含量(mmol/g蛋白)	ALP活性(U/g蛋白)
正常组	8	0.38±0.13	112.82±13.52
钙化组	8	0.94±0.11 ^a	217.50±14.43 ^a
钙化+CST组	8	0.78±0.09 ^{ab}	179.88±12.75 ^{ab}
F值		108.46	217.84
P值		<0.05	<0.05

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与钙化组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 三组大鼠血清MCP-1和TNF-α浓度比较 钙化组大鼠血清MCP-1和TNF-α浓度明显高于正常组大鼠,差异均有统计学意义($P < 0.05$),经CST干预后,

钙化+CST组大鼠的血清MCP-1和TNF-α浓度较钙化组大鼠明显下降,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 三组大鼠的血清MCP-1和TNF-α浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MCP-1(pg/mL)	TNF-α(ng/mL)
正常组	8	65.55±2.35	0.91±0.05
钙化组	8	93.75±3.15 ^a	1.42±0.09 ^a
钙化+CST组	8	79.13±2.23 ^{ab}	1.22±0.07 ^{ab}
F值		512.20	233.85
P值		<0.05	<0.05

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与钙化组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

血管钙化与骨组织的骨化过程类似,细胞表型转化是关键(由收缩型血管平滑肌细胞转变为成骨细胞型),同时合并局部骨相关蛋白和活性因子分泌增多,ALP 活性升高,促进钙盐沉积;促进钙化因子与抑制钙化因子在血管钙化的发展过程中起着至关重要的调节作用。研究已证实,在病理情况下如氧化应激、高血压、高血糖、高脂血症、高尿酸血症以及炎症反应等可导致血管损伤,一些活性因子作为促钙化因子协同促进血管钙化的发展;另一方面,一些活性因子如 Ghrelin 作为血管钙化抑制因子可保护血管功能,从而减轻血管钙化。其过程可能涉及多条信号通道包括 TGF- β /BMPs/Smad 通路和 MAPK 通路等^[3-6]。本课题组的前期研究发现尿酸、醛固酮、salusin β 和部分炎症因子(IL-6、MCP-1、CRP)等活性因子的表达促进血管钙化过程^[3,7-9]。LARIVIÈRE 等^[10]也在慢性肾脏病大鼠模型观察到,随着血管平滑肌细胞分化为成骨样细胞,不仅骨信号分子 BMP-25 和骨钙素表达增加,IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达也同步明显增加。其他文献也证实单核/巨噬细胞分泌的 TNF- α 、IL-6 等炎症因子可诱导血管平滑肌细胞向成骨样表型转化,导致血管钙化的发生与发展^[11]。以上研究均表明炎症因子在血管钙化的发生与发展过程中起着关键的作用。除此,近来研究证实内质网应激和自噬的交互作用可影响血管钙化的发展,实验发现用内质网应激激动剂衣霉素和自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤干预,血管钙化程度均有加重^[12]。而另外一些研究表明抑制钙化因子在血管钙化中同样起着重要作用:胎球蛋白 A 及焦磷酸盐可通过抑制磷酸钙的形成和沉积来抑制血管钙化^[13]。APE1/Ref-1 可通过氧化还原来抑制成骨细胞分化和减少氧化应激,对磷酸盐诱导的血管钙化起抑制作用^[14]。

CST 是一种新的内源性多肽,在心血管疾病中的作用日益受到关注。临床研究表明 CST 不仅可作为原发性高血压、心力衰竭患者的血清标志物,而且在急性冠脉综合征患者中还可预测病情的严重程度^[15-17]。最新的研究表明 CST 可通过抑制炎症反应从而发挥血管保护作用。在糖尿病、结肠炎和动脉粥样硬化小鼠模型中,CST 可减少免疫细胞在受累组织中的浸润,体内外实验均证实其能将巨噬细胞的分化从促炎表型转化为抗炎表型,从而有效发挥抑制炎症作用^[18]。在一项对冠心病患者血清 CST 浓度与动脉粥样硬化程度的相关性的研究中,与健康受试者相比,冠心病患者中血清 CST 浓度明显降低,且与疾病严重程度呈负相关^[19]。对于 CST 作用的信号传导通路也有进一步的研究证实,EISSA 等^[20]在溃疡性结肠炎患者发现 CST 的蛋白和 mRNA 表达水平明显下降,应用 CST 治疗可以使 IL-8 表达下调,用 STAT-3 阻断剂可以阻断 CST 的治疗效应,从而推测 CST 可能通过 STAT-3 依赖途径而发挥调节炎症反应的作用;国内学者在间歇低氧高血压大

鼠实验中发现,CST 可以减轻间歇低氧导致大鼠高血压的效应,并且可使主动脉组织胞浆中核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)蛋白表达显著下调,而胞核中 Nrf2 蛋白表达明显上调,推测 CST 可能与通过 Nrf2-ARE 信号通路作用有关^[21]。

本研究结果显示,应用维生素 D₃联合尼古丁成功诱导血管钙化动物模型,观察到大鼠主动脉钙盐明显沉积,主动脉组织中钙含量增加,ALP 活性上调。各试验组中炎症指标(MCP-1、TNF- α)明显高于正常组,与国内外学者实验结果一致,再次证实炎症因子与血管钙化密切相关。经 CST 干预后,血管钙化的程度明显改善,且大鼠血清炎症因子 MCP-1、TNF- α 表达明显低于钙化组,提示 CST 可能通过抑制炎症因子表达改善血管钙化的程度,从而发挥血管保护作用,但是是否通过其他机制作用尚不清楚(如抑制其他促钙化因子的协同作用)。

综上所述,儿茶酚抑素能抑制血管钙化的进程,可作为临床防治血管钙化新的作用靶点,然而可能涉及的信号通路需进一步研究证实。

参考文献

- SAGE AP, TINTUT Y, DEMER LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(9): 528-536.
- PIERONI M, CORTI A, TOTA B, et al. Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function [J]. Eur Heart J, 2007, 28(9): 1117-1127.
- 张旭升, 黄战军, 曾宪钦, 等. 高尿酸血症对血管钙化作用机制的实验性研究[J]. 实用医药杂志, 2017, 34(4): 342-344.
- 马涛, 王倩, 程治源, 等. Ghrelin 在维生素 D₃ 和尼古丁诱导大鼠血管钙化中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(9): 1349-1353.
- LIU DD, ZHANG JC, ZHANG Q, et al. TGF- β /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1105-1114.
- BUROTT M, CHIOU VL, LEE JM, et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective [J]. Cancer, 2014, 120(22): 3446-3456.
- 张旭升, 黄战军, 朱平先, 等. Salusin- β 在血管钙化模型的表达变化及意义[J]. 岭南心血管病杂志, 2015, 21(1): 99-101, 112.
- 张旭升, 黄战军, 周小欧, 等. 螺内酯对血管钙化大鼠 IL-6 和 MCP-1 表达的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(8): 727-730.
- 张旭升, 周小欧, 黄战军, 等. 大鼠血管钙化模型炎症因子及其受体的表达[J]. 岭南心血管病杂志, 2013, 19(3): 341-345.
- LARIVIÈRE R, GAUTHIER-BASTIEN A, UNG RV, et al. Endothelin type A receptor blockade reduces vascular calcification and inflammation in rats with chronic kidney disease [J]. J Hypertens, 2017, 35(2): 376-384.
- CENERI N, ZHAO L, YOUNG BD, et al. Rac2 modulates atherosclerotic calcification by regulating macrophage interleukin-1 β production [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 37(2): 328-340.
- 李艳青, 付佳, 李彤, 等. 内质网应激与自噬的交互作用对血管钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 11(6): 1099-1105.
- HOLT SG, SMITH ER. Fetus-A-containing calciprotein particles in mineral trafficking and vascular disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(10): 1583-1587.
- ARVIND P, SMEETA S, HYDE GD, et al. FTI-277 inhibits smooth

miR-140-3p 靶向 ANK2 基因对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制研究

惠雪莲,舒瑾,董鹏芸,赵娟

西安市中医院妇科,陕西 西安 710021

【摘要】目的 探讨微小RNA-140-3p (miR-140-3p)对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。**方法** 选取于2016年2月至2018年9月在西安市中医院行手术治疗的59例子宫肌瘤患者为研究对象,同时期41例因子宫肌瘤切除全子宫的正常子宫肌组织作为对照,实时荧光定量PCR (RT-qPCR)检测组织中miR-140-3p和锚蛋白B (ANK2) mRNA表达水平。子宫肌瘤细胞分为miR-140-3p组(转染miR-140-3p模拟物mimics)、miR-NC组(转染mimics阴性对照序列)、si-ANK2组(转染ANK2小干扰RNA)、si-NC组(转染乱序无意义阴性序列)、miR-140-3p+pcDNA-ANK2组(共转染miR-140-3p mimics与ANK2过表达载体)和miR-140-3p+pcDNA组(共转染miR-140-3p mimics与空载体)。RT-qPCR和蛋白印迹(Western blot)分别检测miR-140-3p或ANK2蛋白水平验证转染效果,四甲基噻唑蓝染色法(MTT)检测各组细胞增殖情况,Transwell检测各组细胞的迁移和侵袭能力,Western blot检测各组细胞中细胞周期蛋白D1 (CyclinD1)、p21、基质金属蛋白酶2 (MMP-2)、E-钙黏附素(E-cadherin)蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证子宫肌瘤细胞中miR-140-3p和ANK2调控关系。**结果** 与正常宫颈组织比较,子宫肌瘤组织中miR-140-3p表达水平降低[(0.38 ± 0.04) vs (1.06 ± 0.09)], ANK2 mRNA表达水平升高[(2.61 ± 0.24) vs (1.07 ± 0.10)],差异均具有统计学意义($P<0.05$);与miR-NC组比较,miR-140-3p组子宫肌瘤细胞存活率[(62.37 ± 1.59)% vs (99.63 ± 3.28)%]、迁移细胞数[(72.58 ± 8.19) vs (139.25 ± 12.34)]、侵袭细胞数[(53.91 ± 6.18) vs (115.21 ± 10.69)]、CyclinD1蛋白水平[(0.23 ± 0.04) vs (0.98 ± 0.11)]和MMP-2蛋白水平[(0.19 ± 0.03) vs (0.53 ± 0.06)]降低,而p21蛋白水平[(0.82 ± 0.08) vs (0.29 ± 0.05)]和E-cadherin蛋白水平[(0.57 ± 0.07) vs (0.21 ± 0.05)]升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与si-NC组比较,si-ANK2组子宫肌瘤细胞存活率[(72.59 ± 2.08)% vs (98.67 ± 3.58)%]、迁移细胞数[(75.69 ± 8.54) vs (142.58 ± 12.86)]、侵袭细胞数[(58.39 ± 6.58) vs (123.67 ± 11.24)]、CyclinD1蛋白水平[(0.39 ± 0.03) vs (0.68 ± 0.06)]和MMP-2蛋白水平[(0.21 ± 0.04) vs (0.59 ± 0.04)]降低,p21蛋白水平[(0.45 ± 0.07) vs (0.29 ± 0.05)]和E-cadherin蛋白水平[(0.43 ± 0.05) vs (0.19 ± 0.03)]升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与miR-140-3p+pcDNA组比较,miR-140-3p+pcDNA-ANK2组子宫肌瘤细胞存活率[(87.39 ± 3.02)% vs (61.23 ± 1.41)%]、迁移细胞数[(146.28 ± 12.57) vs (75.49 ± 8.25)]、侵袭细胞数[(119.24 ± 11.08) vs (56.39 ± 6.24)]、CyclinD1蛋白水平[(0.58 ± 0.05) vs (0.21 ± 0.04)]和MMP-2蛋白水平[(0.48 ± 0.05) vs (0.22 ± 0.02)]升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),p21蛋白水平[(0.25 ± 0.04) vs (0.53 ± 0.06)]和E-cadherin蛋白水平[(0.34 ± 0.03) vs (0.56 ± 0.05)]降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 过表达miR-140-3p通过靶向下调ANK2表达抑制子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 子宫肌瘤;miR-140-3p;锚蛋白B;细胞增殖;迁移;侵袭

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2020)05—0548—05

Effect of miR-140-3p targeting ANK2 gene on proliferation, migration, and invasion of uterine fibroid cells. HUI Xue-lian, SHU Jin, DONG Li-yun, ZHAO Juan. Department of Gynecology, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, Shaanxi, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of microRNA-140-3p (miR-140-3p) on the proliferation, mi-

通讯作者:董鹏芸,E-mail:563261699@qq.com

muscle cell calcification by up-regulating PI3K/Akt signaling and inhibiting apoptosis [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196232.

[15] 姜娟,孙宁玲.不同血压及代谢水平患者血浆CST变化的探讨[J].中华高血压杂志,2017,25(2): 200.

[16] 赵晓辉,高伟勤,杨军.心衰患者血浆CST和脑钠肽水平变化及其相关性[J].心血管康复医学杂志,2016,25(2): 145-147.

[17] 李洁,荆忱,刘义欣,等.CST在急性冠状动脉综合征患者中的检测价值[J].临床心血管病杂志,2016,32(6): 566-569.

[18] MUNTJEWERFF ELKE M, DUNKEL G, NICOLASEN MARA JT, et al. Catestatin as a target for treatment of inflammatory diseases [J].

Frontiers in immunology, 2018, 9: 2199.

[19] CHEN YJ, WANG XQ, YANG CD, et al. Decreased circulating catesstatin levels are associated with coronary artery disease: The emerging anti-inflammatory role [J]. Atherosclerosis, 2019, 28(1): 78-88.

[20] EISSA N, HUSSEIN H, MESGNA R, et al. Catestatin regulates epithelial cell dynamics to improve intestinal inflammation [J]. Vaccines (Basel), 2018, 6(4): pii: E67.

[21] 陈然,范小芳,郑青青,等.CST对间歇低氧高血压大鼠的影响及机制[J].中国病理生理杂志,2016,32(8): 1523-1524.

(收稿日期:2019-09-24)