

慢性间歇性低压低氧抑制内质网应激改善大鼠血管钙化

李艳青², 杨锐¹, 金胜¹, 袁芳¹, 武宇明¹, 张翼¹, 滕旭^{1,3}

(1. 河北医科大学生理教研室, 河北省石家庄市 050017; 2. 河北省中医院妇科, 河北省石家庄市 050011;

3. 河北省实验动物重点实验室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 慢性间歇性低压低氧; 血管钙化; 血管平滑肌细胞; 内质网应激

[摘要] **目的** 证实慢性间歇性低压低氧(CIHH)通过抑制内质网应激(ERS)改善大鼠血管钙化。**方法** 使用维生素 D3 肌注和尼古丁灌胃(VDN)制备的大鼠在体血管钙化模型,检测主动脉组织 Ca^{2+} 含量和碱性磷酸酶(ALP)活性以及血浆 ALP 活性,Western blot 检测相关蛋白的表达水平。**结果** 与对照组大鼠相比,VDN 大鼠主动脉组织 Ca^{2+} 含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性均显著升高($P < 0.05$),同时主动脉组织平滑肌细胞收缩表型标志蛋白 calponin 和 SM22 α 的表达水平显著下调($P < 0.05$),成骨样细胞表型标志蛋白骨形态发生蛋白 2(BMP2)和 RUNX2 的表达水平显著上调($P < 0.05$)。而 CIHH 能够显著改善 VDN 大鼠的上述改变。此外,VDN 大鼠主动脉组织 ERS 标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、CHOP(C/EBP homologous protein)和 active-caspase12 的表达水平较对照组大鼠显著升高($P < 0.05$),而 CIHH 能够显著抑制上述蛋白表达水平的升高($P < 0.05$)。**结论** CIHH 可能通过抑制 ERS,发挥改善血管钙化和平滑肌细胞表型转化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Ameliorates Vascular Calcification via Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress in Rats

LI Yan-Qing², YANG Rui¹, JIN Shen¹, YUAN Fang¹, WU Yu-Ming¹, ZHANG Yi¹, and TENG Xu^{1,3}

(1. Department of Physiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China; 2. Department of Gynecology, Hebei Traditional Medicine Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 3. Hebei Key Laboratory of Laboratory Animal, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

[KEY WORDS] Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia; Vascular Calcification; Vascular Smooth Muscle Cell; Endoplasmic Reticulum Stress

[ABSTRACT] **Aim** To determine that chronic intermittent hypobaric hypoxia (CIHH) could improve vascular calcification (VC) through blocked endoplasmic reticulum stress (ERS). **Methods** He rats model of VC was induced by vitamin D3 plus nicotine (VDN). The Ca^{2+} content of aorta and alkaline phosphatase (ALP) activity of aorta and plasma was detected. The protein expression level was measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, Ca^{2+} content of aorta and alkaline phosphatase (ALP) activity of aorta and plasma was significantly increased in VDN rats ($P < 0.05$). In calcified vascular, the protein expression of contractile phenotype of vascular smooth muscle cell (VSMC), calponin and SM22 α , was down-regulated ($P < 0.05$), while that of osteoblast-like phenotype of VSMC, BMP2 and RUNX2 was up-regulated. CIHH could improve the all aboved issues ($P < 0.05$). Furthermore, CIHH could prevent the induction of protein level of ERS markers, GRP78, CHOP and active-caspase12 in calcified aorta ($P < 0.05$). **Conclusions** These results suggested that CIHH could ameliorate VC through inhibiting ERS, which might provide new strategy and target for prevention and therapy of VC.

[收稿日期] 2015-01-18

[修回日期] 2015-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81100229);河北省自然科学基金(C2012206063)

[作者简介] 李艳青, 硕士, 主治医师, 研究方向为慢性间歇性低压低氧对包括生殖系统在内的生理和病理生理过程的影响, E-mail 为 liyanqing81@163.com。通讯作者滕旭, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管内源性保护机制, E-mail 为 tengxu78@163.com。

血管钙化 (vascular calcification, VC) 是一种常见的血管病理表现, 与动脉粥样硬化和高血压等多种疾病密切相关^[1], 是恶性心血管事件发生的危险因素^[2-3]。目前认为, VC 是一个与骨形成类似的可调控的主动过程。其中, 血管平滑肌细胞由收缩表型向成骨细胞样表型转化在其发生发展中发挥重要作用^[4]。慢性间歇性低压低氧 (chronic intermittent hypobaric hypoxia, CIHH) 是间断性的模拟高海拔的低压低氧^[5]。已证实, CIHH 能够舒张血管和改善高血压。其可抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠胸主动脉收缩^[6], 增强乙酰胆碱诱导的胸主动脉舒张^[7], 改善高血压患者和自发性高血压大鼠的血压^[8-9], 增加大鼠压力感受性反射敏感性^[10]。但是, CIHH 对 VC 的作用并不清楚。因此, 我们提出假说认为 CIHH 能够改善 VC。本实验利用 VitD3 肌注和尼古丁灌胃 (VDN) 制备的大鼠 VC 模型, 探讨 CIHH 的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选用 180 ~ 200 g 清洁级 SD 雄性大鼠, 所使用实验动物由河北医科大学实验动物中心提供, 动物饲养和实验程序按中国动物管理条例 (中华人民共和国卫生部 2001 年第 55 号文件) 规定的动物实验标准执行。常规条件下饲养, 室内温度 22 ~ 24 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 每天光线照射 12 h, 自由进食和饮水, 实验操作前 12 h 禁食, 自由饮水。实验动物随机分为 4 组: 对照组, 钙化组, CIHH 组和 CIHH + 钙化组。

1.2 试剂与材料

RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) 和葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78kDa, GRP78) 的抗体购自 Epitomic 公司 (USA), SM22 α (smooth muscle 22 α)、骨形态发生蛋白 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2) 和 β -actin 的抗体购自 GeneTex 公司 (USA), CHOP (C/EBP homologous protein) 和 active-caspase12 的抗体购自 Affinity Biosciences Inc (USA), 二抗购自 Kirkegaard & Perry Laboratories Inc (USA)。化学发光试剂盒购自 Multi-Sciences Biotech Co (CN)。VitD3 和尼古丁购自 Sigma 公司 (USA)。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性和 Ca^{2+} 含量测定试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司 (CN)。

1.3 大鼠血管钙化模型制备

参照 Niederhoffer^[11] 的方法制备钙化动物模型。8 am 给予大鼠肌注 VitD3 (300,000 U/kg) 和尼古丁 (25 mg/kg, 混入花生油 2 mL 中) 灌胃, 8 pm 再灌胃 1 次; 第二日 8 am 再次肌注 VitD3 1 次。常规饲养 4 周后进行各项指标检测。对照组大鼠于相同时间点进行相同容积 VitD3 溶剂肌肉注射和花生油灌胃。

1.4 CIHH 处理

需进行 CIHH 组的动物于最后一次 VitD3 肌肉注射后第二天置于低压氧舱接受模拟 5 000 m 海拔高度 (气压 404 mmHg, 氧分压 85 mmHg) 的低压低氧处理, 每天 6 h, 自由进食和饮水, 连续 4 周。对照组大鼠于相同时间段置于低压氧舱外。实验过程中, 各组动物的一般状态, 包括体重、饮食和活动均无明显变化。

1.5 血管钙含量测定

取腹主动脉约 1 cm 剥除外膜后烤干, 称量其干重。将血管放入玻璃长试管中, 加入浓硝酸 300 μL 硝化。180°C 烘烤使硝酸挥发干净。试管中加入去离子水 400 μL 数次, 至 pH 为中性时为止。然后将水烤干。用含 27 nmol/L KCl 和 27 mol/L LaCl_3 的去离子水复溶玻璃管壁内的钙。过夜后收集至洁净 EP 管中, 常温保存。使用 Ca^{2+} 含量测定试剂盒检测溶液中 Ca^{2+} 含量, 具体操作参照说明书进行。将测得的数值除以主动脉干重, 计算每 g 干重的钙含量。

1.6 血浆和血管组织 ALP 活性测定

大鼠处死前自腹主动脉抽取血液, 加入肝素抗凝后, 4°C 3000 r/min 离心 20 min 取血浆待测。取大鼠胸主动脉约 1 cm 剥除外膜后, 用玻璃匀浆器制成匀浆。4°C 8000 r/min 离心 10 min, 取上清放于冰上作为样本备用。取血浆和主动脉匀浆上清液各 50 μL , 使用 ALP 活性检测试剂盒测定其 ALP 活性, 具体操作根据说明书进行。血浆 ALP 活性单位为 IU/L, 血管 ALP 活性以蛋白含量 (Bradford 法测定) 进行标化。

1.7 Western blot

取主动脉约 50 mg 加入 500 μL 裂解液匀浆后, 4°C 8000 r/min 离心 10 min 取上清液。Bradford 法检测上清液中蛋白含量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳后转膜, 10% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 4°C 过夜, 二抗常温孵育 1 h 后, 以化学发光法显色发光。

1.8 统计学分析

计数资料采用 $\bar{x} \pm s$, 2 组以上比较采用单因素方差分析, 进一步进行组间比较采用 Turkey 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 血管钙化大鼠一般特征

与对照组大鼠相比, 钙化组大鼠主动脉钙含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性均显著升高 ($P < 0.05$; 图 1)。Western blot 检测结果显示, 钙化组大鼠血管平滑肌细胞收缩表型的蛋白标志物 calponin 和 SM22 α 的表达均显著降低 ($P < 0.05$; 图 2), 而成骨样细胞表型的蛋白标志物 BMP2 和 RUNX2 的表达均显著升高 ($P < 0.05$; 图 3)。

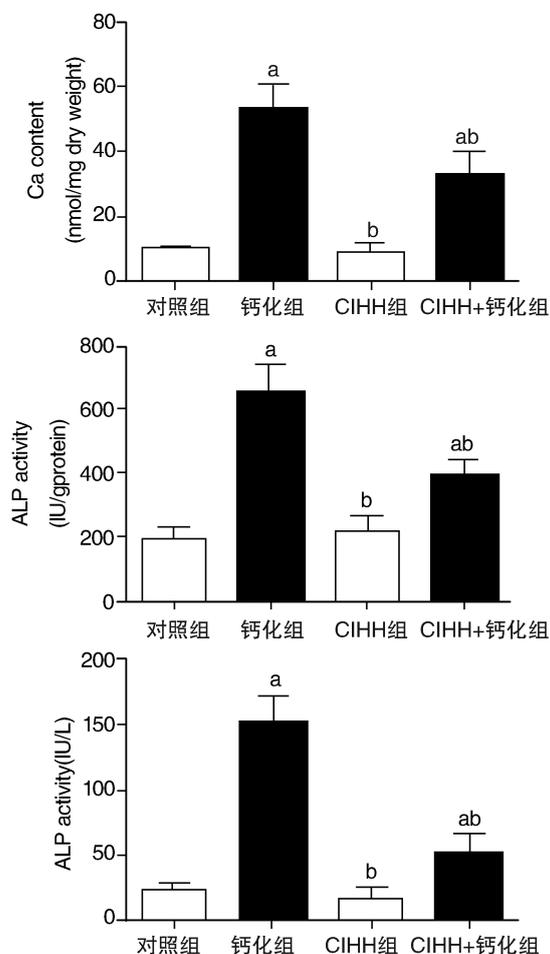


图 1. 大鼠主动脉组织 Ca^{2+} 含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性 ($n = 6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 1. Ca^{2+} content in aorta and ALP activity in aorta and plasma

2.2 CIHH 改善大鼠血管钙化

经 CIHH 处理后, 能够显著抑制钙化大鼠血管主动脉钙含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性的升高 ($P < 0.05$; 图 1)。Western blot 检测结果显示, CIHH 处理能够改善钙化血管 calponin 和 SM22 α 蛋白表达的下调 ($P < 0.05$; 图 2), 同时抑制 BMP2 和 RUNX2 蛋白表达的上调 ($P < 0.05$; 图 3)。而正常大鼠接受单纯 CIHH 处理, 上述指标与对照组大鼠相比无显著性变化。

2.3 CIHH 抑制血管钙化大鼠主动脉组织内质网应激反应

Western blot 检测结果显示, 与对照组大鼠相比, 钙化组大鼠主动脉组织内质网应激标志蛋白 GRP78、CHOP 和 active-caspase12 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$; 图 4)。而 CIHH 处理后能够显著抑制钙化大鼠主动脉上述蛋白的上调 ($P < 0.05$; 图 4)。正常大鼠接受单纯 CIHH 处理, 上述指标与对照组大鼠相比无显著性变化。

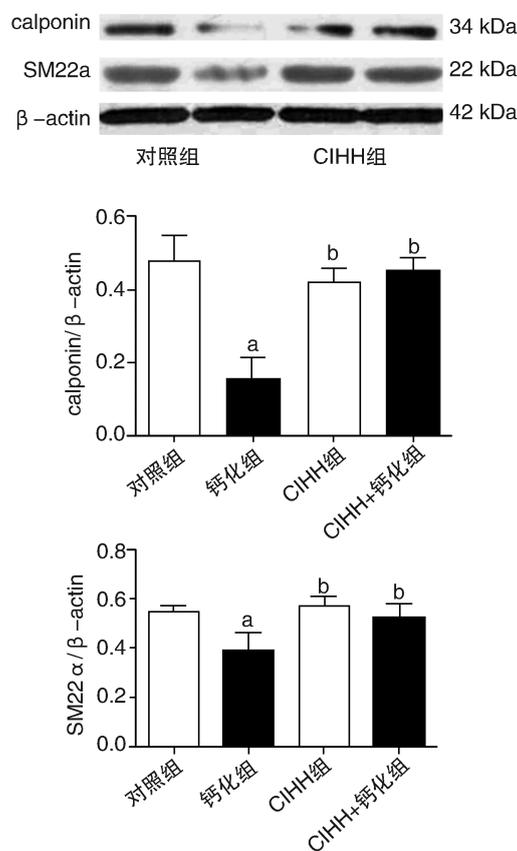


图 2. Western blot 检测大鼠主动脉组织 calponin 和 SM22 α 蛋白表达水平 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 2. The protein expression of calponin and SM22 α in aorta of rats detected by Western blot

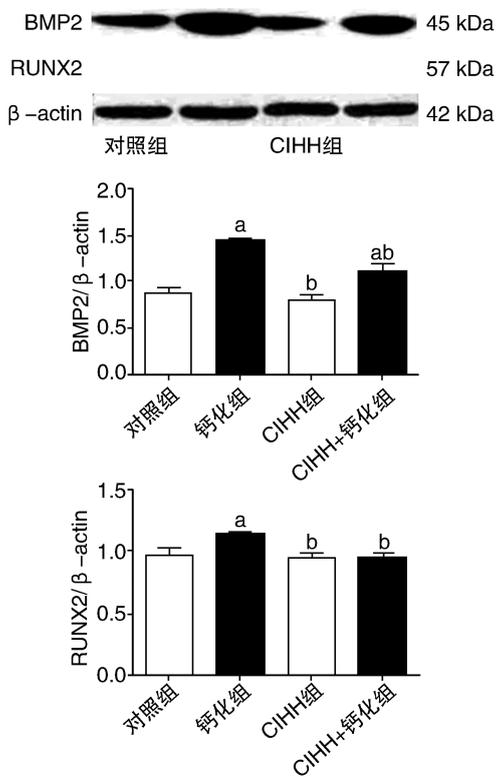


图 3. Western blot 检测大鼠主动脉组织 BMP2 和 RUNX2 蛋白表达水平 ($n=3$) a 为 $P<0.05$ 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与钙化组。

Figure 3. The protein expression of BMP2 and RUNX2 in aorta of rats detected by Western blot

3 讨论

本研究利用 VDN 血管钙化大鼠模型发现, CIHH 能够显著改善血管钙化, 抑制血管平滑肌细胞的表型转化。同时发现, 血管钙化大鼠主动脉组织有明显的 ERS 反应, 而 CIHH 能够显著抑制钙化血管的 ERS 反应。上述结果提示, CIHH 可能通过抑制 ERS 反应发挥改善血管钙化的作用, 为血管钙化的预防和治疗提供了新的策略和靶点。

大鼠 VDN 血管钙化模型是目前较为常用的研究血管钙化的动物模型。大剂量维生素 D3 可导致血管组织钙含量增加, 尼古丁可增强维生素 D3 的作用, 两者协同最终导致血管钙化的发生, 并且主要表现为血管中膜的钙化^[12]。血管钙化时, 血管组织钙含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性均显著升高, 是反映血管钙化的普遍采用的检测指标^[13]。此外, 近年来的研究证实血管平滑肌细胞由收缩表型向成骨样细胞表型转化在血管钙化的发生发展过程中发挥重要作用^[4]。本研究同样发现, VDN 大鼠主动脉组织钙含量和 ALP 活性及血浆 ALP 活性均

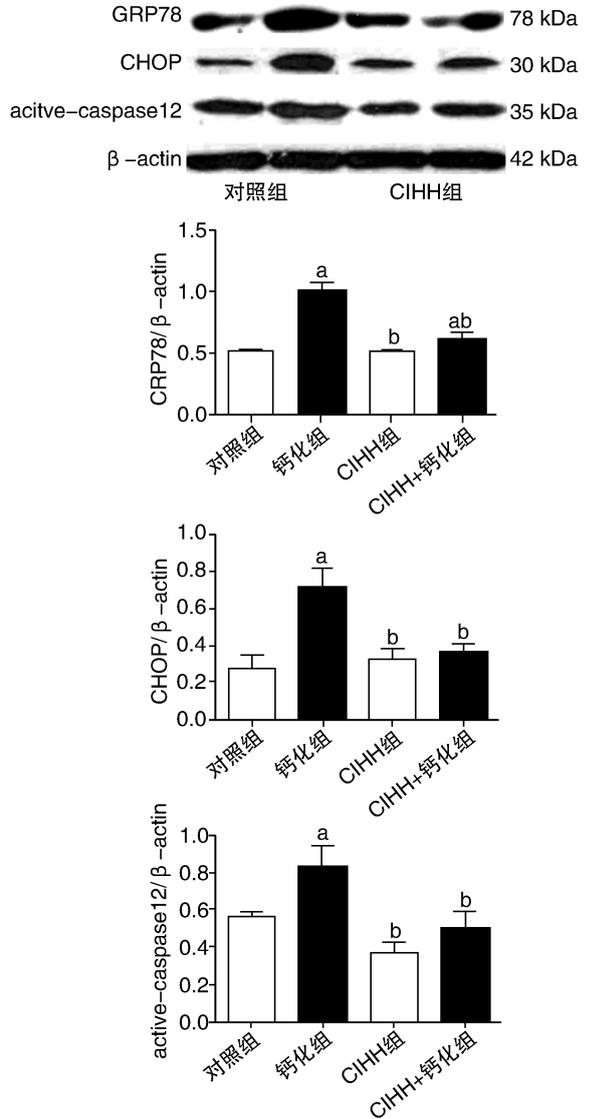


图 4. Western blot 检测大鼠主动脉组织 GRP78、CHOP 和 active-caspase12 蛋白表达水平 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与钙化组比较。

Figure 4. The protein expression of GRP78, CHOP and active-caspase12 in aorta of rats detected by Western blot

显著升高, 并且主动脉平滑肌细胞收缩表型标志蛋白 calponin 和 SM22 α 的表达水平显著降低, 成骨细胞样表型标志蛋白 BMP2 和 RUNX2 的表达水平显著增加。上述结果证实, VDN 大鼠出现明显的血管钙化和平滑肌细胞表型转化。

CIHH 具有显著的心血管保护和舒张血管的作用^[5]。本研究发现, CIHH 能够显著降低 VDN 大鼠主动脉组织钙含量和 ALP 活性以及血浆 ALP 活性, 同时 CIHH 能够升高 VDN 大鼠主动脉组织平滑肌细胞收缩表型标志蛋白表达的下调, 同时抑制成骨细胞表型蛋白标志的上调。上述结果说明, CIHH 能够显著抑制 VDN 大鼠血管钙化的程度, 改善主动

脉平滑肌细胞的表型转化。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指内质网稳态被破坏后,例如大量未折叠或者错误折叠的蛋白质大量积聚、Ca²⁺大量耗竭等,由此引发的一系列细胞内反应。ERS 的发生与包括心肌缺血/再灌注损伤、心力衰竭和动脉粥样硬化在内的多种心血管疾病密切相关^[14]。近年来的研究发现,ERS 参与了血管钙化的发生发展。一方面,ERS 导致的血管平滑肌细胞凋亡促进了血管钙化的发生^[15];另一方面,ERS 具有促进平滑肌细胞表型转化的作用^[16]。而通过抑制 ERS 能够发挥改善血管钙化的作用^[17]。本研究结果发现,VDN 大鼠钙化血管组织 ERS 标志蛋白 GRP78、CHOP 和 active-caspase12 的表达水平显著升高,而 CIHH 能够抑制其升高。上述研究结果提示,CIHH 可能通过抑制 ERS 发挥改善血管钙化和平滑肌细胞表型转化的作用。

[参考文献]

- [1] Liberman M, Pesaro AE, Carmo LS, et al. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications [J]. *Einstein (Sao Paulo)*, 2013, 11(3): 376-382.
- [2] Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(13): 1 336-345.
- [3] DeFilippis AP, Blaha MJ, Ndumele CE, et al. The association of Framingham and Reynolds risk scores with incidence and progression of coronary artery calcification in MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(20): 2 076-083.
- [4] Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014 [Epub ahead of print].
- [5] Zhang Y, Zhou ZN. Beneficial effects of intermittent hypobaric hypoxia on the body [J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2012, 28(6): 504-509.
- [6] 宋士军,徐瑛,李芳芳,等. 慢性间歇性低血压低氧对大鼠动脉血管收缩功能的影响 [J]. *生理学报*, 2011, 63(3): 205-210.

- [7] 袁芳,李宏伟,宋士军,等. 阿片受体介导慢性间歇性低血压低氧对大鼠主动脉乙酰胆碱诱导舒张的增强效应 [J]. *生理学报*, 2013, 65(3): 269-275.
- [8] Behm R, Honig A, Griethe M, et al. Sustained suppression of voluntary sodium intake of spontaneously hypertensive rats (SHR) in hypobaric hypoxia [J]. *Biomed Biochem Acta*, 1984, 43(7): 975-985.
- [9] Katiukhin VN, Shliakhto EV, Shuiskaia GA. Effect of discontinuous high-altitude barotherapy on the hemodynamics in arterial hypertension [J]. *Kardiologiia*, 1979, 19(2): 107-108.
- [10] Gao L, Guan Y, Cui F, et al. Facilitation of chronic intermittent hypobaric hypoxia on carotid sinus baroreflex in anesthetized rats. *Chin J Physiol*, 2012, 55(1): 62-70.
- [11] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idijouadiene I, et al. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *J Vasc Res*, 1997, 34(5): 386-388.
- [12] 史祎,周业波,蔡嫣,等. 不同年龄对维生素 D3 和尼古丁诱导大鼠血管钙化的影响 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42(2): 131-136.
- [13] Sahin I, Karabulut A, Gungor B, et al. Correlation between the serum alkaline phosphatase level and the severity of coronary artery disease [J]. *Coron Artery Dis*, 2014, 25(4): 349-352.
- [14] Sozen E, Karademir B, Ozer NK. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 78: 30-41.
- [15] Duan XH, Chang JR, Zhang J, et al. Activating transcription factor4 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to vascular calcification [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(9): 1 132-144.
- [16] Liberman M, Johnson RC, Handy DE, et al. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(3): 436-441.
- [17] Chang JR, Duan XH, Zhang BH, et al. Intermedin1-53 attenuates vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress via cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(10): 1 136-146.

(此文编辑 李小玲)