

· 论 著 ·

瘦素对主动脉瓣间质细胞成骨分化的作用及机制研究

胡国栋^{1,2}, 李明科¹, 周景昕¹, 唐义虎¹, 刘翔¹, 朱锦富¹, 吴延虎¹

1. 南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 江苏 南京 210029;

2. 徐州医科大学附属淮安医院, 江苏 淮安 223002

摘要: **目的** 探讨瘦素(Leptin)体外刺激对主动脉瓣膜间质细胞(VICs)成骨分化的作用及其机制。**方法** 胶原酶消化法分离并培养猪主动脉瓣膜间质细胞,采用 100 ng/ml Leptin 刺激细胞 24 h,提取细胞 RNA 以及蛋白,通过实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)以及免疫印迹试验(Western blot)分别测定成骨标志物核心结合因子 α_1 (RUNX-2)mRNA 及蛋白的表达情况,同时采用 Western blot 检测核因子(NF)- κ B 总蛋白及磷酸化 NF- κ B 蛋白(p-NF- κ B)的表达情况。在 Leptin 刺激的同时,采用 NF- κ B 特异性抑制剂 SN50 干预 VICs,再次检测 RUNX-2 的表达情况。**结果** Leptin 刺激导致 Runx-2 mRNA 及蛋白表达显著上调,同时 p-NF- κ B 蛋白表达显著增加,而 SN50 干预后 Runx-2 蛋白表达显著下调(P 均 < 0.05)。**结论** Leptin 可致 VICs 成骨标志物 RUNX-2 表达增加,SN50 干预可致 RUNX-2 蛋白表达下调,表明其能够诱导 VICs 向成骨细胞分化,并且这种作用是通过 NF- κ B 相关信号通路实现的。

关键词: 瘦素; 主动脉瓣膜间质细胞; 核心结合因子 α_1 ; 核因子- κ B; 核因子- κ B 特异性抑制剂

中图分类号: R 654 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)10-1319-04

Effect of leptin on osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells and its mechanism

HU Guo-dong*, LI Ming-ke, ZHOU Jing-xin, TANG Yi-hu, LIU Xiang, ZHU Jin-fu, WU Yan-hu

* Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Corresponding author: WU Yan-hu, E-mail: wuyanhu@njmu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of leptin on osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells (VICs) and its mechanism. **Methods** Porcine aortic VICs were separated and cultured by collagenase digestion method. After being stimulated with 100 ng/ml leptin for 24 hours, VICs RNA and protein were extracted. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expressions of osteogenic marker core binding factor α_1 (runt-related transcription factor-2, RUNX-2) mRNA and protein, respectively. Western blot was used to detect the expressions of nuclear factor(NF)- κ B total protein(t-NF- κ B) and phosphorylated NF- κ B protein(p-NF- κ B). At the same time as leptin intervention, the VICs were intervened by SN50 (NF- κ B-specific inhibitor), and then the expression of RUNX-2 protein was detected again. **Results** RUNX-2 mRNA and protein expressions and p-NF- κ B protein expression were significantly up-regulated after leptin stimulation, but RUNX-2 protein expression was significantly down-regulated after SN50 intervention (all $P < 0.05$). **Conclusions** Leptin can lead to the increase of osteogenic marker RUNX-2 expression, while SN50 intervention can induce down regulation of RUNX-2 protein expression. It is that leptin can induce VICs differentiation to osteoblast cells, and this effect is achieved by NF- κ B-related signal pathway.

Key words: Leptin; Aortic valve interstitial cells; Runt-related transcription factor-2 (Runtrelatal protein 2); Nuclear factor- κ B; NF- κ B-specific inhibitor (SN50)

钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)是一个较为普遍的临床问题。有报道称 65 岁以上人群中 25% 存在不同程度的主动脉瓣狭

窄,而钙化性主动脉瓣狭窄在老年人群中的发病率超过 4%^[1]。在欧美国家,钙化性主动脉瓣狭窄是心脏手术最常见的指征之一^[2-3],而在我国,随着人口的

老龄化,CAVD 的发病率正逐年升高,已经或者即将成为我国瓣膜疾病的首要病因。过去认为 CAVD 是一种退行性疾病,是由钙磷结晶在瓣膜表面被动性沉积导致的,而目前多项实验研究结果表明,CAVD 是一种由多种细胞活动以及信号通路参与的主动调节的病理过程^[4],而瓣膜间质细胞(VICs)在此过程中扮演了重要的角色。多项研究表明,VICs 在多种病理刺激下可向肌成纤维细胞(myofibroblast)以及成骨细胞(osteoblast)转化,这是 CAVD 形成的重要机制^[5]。瘦素(Leptin)是由脂肪组织或脂肪细胞分泌的一种多肽类激素,其受体存在于多种组织器官内^[6]。瘦素的生理功能包括调节能量代谢、调节生长发育、调节食物摄入、调节血脂代谢、调节胰岛细胞功能等,而最近的研究表明,瘦素能够诱导血管平滑肌细胞向成骨细胞表型分化,从而促进血管钙化形成^[7]。吴自昌等^[8]研究结果表明,在老年钙化性瓣膜病患者病变瓣膜中瘦素表达显著增加。瘦素在 CAVD 中的作用及机制尚未明确,本研究旨在明确瘦素体外刺激对于 VICs 表型转化的作用以及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 主动脉瓣叶取自健康的成年家猪(镇江句容屠宰场),高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、PBS 缓冲液、青霉素/链霉素(Pen/Strep)、0.25% 胰酶-EDTA 均购自 Gibico 公司,重组猪瘦素(recombinant Porcine Leptin)购自 Prospec 公司,I 型胶原酶购自 Sigma 公司,核因子(NF)- κ B p65 抑制剂 SN50 购自 Santa Cruz 公司。抗体:核心结合因子 α_1 (runt-related transcriptial factor-2, RUNX-2)、核因子(NF)- κ B p65 总蛋白以及磷酸化抗体购自 Abcam 公司。内参 GAPDH 以及 RUNX-2 引物均购自南京锐真生物技术有限公司。全蛋白提取试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 VICs 分离与培养 成年健康家猪处死后,完整取下心脏以及主动脉根部。纵行剖开主动脉根部,剪下主动脉瓣瓣叶组织,采用含有双抗的 PBS 溶液反复冲洗后置入含有 0.1% 胶原酶溶液中,37 °C 放置 15 min。用无菌棉签反复擦拭瓣叶表面,尽可能去除内皮细胞。再次将瓣叶置入 0.1% 胶原酶溶液中,37 °C 放置过夜。离心 2 000 rpm,5 min,去上清,10 ml 高糖 DMEM 培养基(DMEM + 10% FBS + 双抗)重悬,转移至培养皿中,置于 5% CO₂ + 37 °C 孵箱中,次日换液,此后每 2 ~ 3 天换液 1 次,待细胞在 80% ~ 90% 融合时传代备用。

1.2.2 实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 VICs RUNX-2 mRNA 的表达情况 VICs 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板上。对照组($n = 3$)用含 10% FBS DMEM 培养,实验组($n = 3$)用含瘦素浓度 100 ng/ml 的 10% FBS DMEM 培养。两组均刺激 24 h 后采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。通过 qRT-PCR 检测成骨标志物 RUNX-2 mRNA 相对表达水平。逆转录反应体系为 10 μ l 体系。逆转录反应条件为:42 °C 15 min,87 °C 5 s,4 °C 保存。PCR 扩增体系为 20 μ l [cDNA 1 μ l,上下游引物各 1 μ l,ROX 液 7 μ l,焦磷酸二乙酯(DEPC)水 10 μ l],PCR 反应条件为:95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 60 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因表达的相对值。计算公式如下: $\Delta CT = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{试验样品}} - \Delta CT_{\text{基准样品}}$ 。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	序列(5'→3')	Tm(°C)
RUNX-2	上游:GGA CGA GGC AAG AGT TTC AC	60
	下游:GTG GAT TAA AAG GAC TTG GTG C	
GAPDH	上游:AAT GGG GTT CAA CGG GTT AC	60
	下游:TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC	

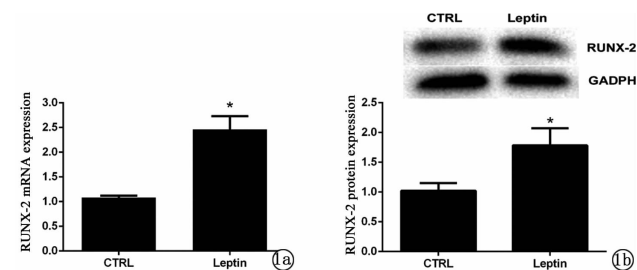
1.2.3 免疫印迹试验(Western blot)检测 VICs RUNX-2、t-NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白的表达情况 VICs 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板上。对照组($n = 3$)用含 10% FBS DMEM 培养;瘦素组($n = 3$)用含瘦素浓度 100 ng/ml 的 10% FBS DMEM 培养;为进一步探讨瘦素对 RUNX-2 蛋白表达的影响是否通过 NF- κ B 相关信号通路实现,在瘦素干预的同时采用 NF- κ B 特异性抑制剂 SN50 干预(瘦素 + SN50 组),采用含瘦素及 SN50 浓度均为 100 ng/ml 的 10% FBS DMEM 培养。三组均刺激 24 h,细胞总蛋白采用全蛋白提取试剂盒提取,BCA 法进行蛋白定量。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜取出后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。取出膜,用 TBST 洗膜三次,每次 10 min。将一抗用含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释至合适浓度,放入 PVDF 膜,4 °C 过夜;用 TBST 洗 3 次;用合适浓度的二抗稀释液在室温条件下孵育 1 h。将 PVDF 膜用发光试剂显色,凝胶成像系统扫描获取图像。使用 Image J 软件分析条带灰度值。以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。各实验独立重复 3 次以上,计量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及两两比较 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

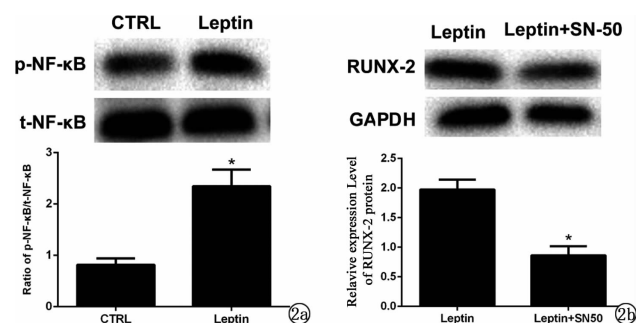
2.1 瘦素对 VICs RUNX-2 mRNA 及蛋白表达的影响 采用含有瘦素浓度 100 ng/ml 的高糖 DMEM 培养基干预 VICs 24 h 后分别提取 RNA 以及蛋白, RT-PCR 检测结果提示瘦素组 RUNX-2 mRNA 表达较对照组显著增加 ($P < 0.05$) (图 1a)。Western blot 检测结果提示瘦素组 RUNX-2 蛋白表达较对照组显著增加 ($P < 0.05$) (图 1b)。

2.2 瘦素对 VICs NF- κ B 相关信号通路激活表达的影响 采用瘦素干预 VICs 后, Western blot 检测结果提示对照组和瘦素组 NF- κ B 总蛋白 (t-NF- κ B) 表达无显著变化, 但瘦素组 NF- κ B 磷酸化 (p-NF- κ B) 表达较对照组显著增加 ($P < 0.05$) (图 2a)。另外, 发现瘦素 + SN50 组 RUNX-2 蛋白表达较单用瘦素组显著降低 ($P < 0.05$) (图 2b)。



注: 1a; RT-PCR 检测两组 RUNX-2 mRNA 表达情况; 1b; Western blot 检测两组 RUNX-2 蛋白表达情况; 与对照组 (CTRL) 比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 瘦素对 VICs RUNX-2 mRNA 及蛋白表达的影响



注: 2a; Western blot 检测两组 p-NF- κ B 蛋白表达情况, 与对照组 (CTRL) 比较, * $P < 0.05$; 2b; Western blot 检测 Leptin 及 Leptin + SN50 组 RUNX-2 蛋白表达情况, 与 Leptin 比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 瘦素对 VICs NF- κ B 相关信号通路激活表达的影响

3 讨论

瘦素是一种大小约为 16 000 的分泌型蛋白, 主要作用于下丘脑, 调节能量的摄取以及释放, 体内多种组织器官中均有瘦素受体表达^[9]。在心血管系统的相关研究中, 瘦素具有交感活性、升压作用、胰岛素抵抗、调节血管功能、促进血小板聚集、诱导氧化应

激、调节炎症反应、促血管生成等多种功能, 在心血管疾病的发生、发展过程中起着重要的调节作用^[10]。近年来多项研究表明, 瘦素能够促进血管平滑肌细胞表型向成骨细胞转分化, 成骨表面标志 NF- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 以及骨桥蛋白 (OPN) 等表达显著增加, 从而促进了血管的钙化^[11-12]。而在瓣膜钙化的病理过程中^[13], VICs 在多种致病因素的作用下可以向成骨细胞转分化, 成骨相关标志物表达显著增加, 这被认为是瓣膜钙化的重要机制之一。在本研究中, 我们采用瘦素干预 VICs, 结果发现成骨标志物 RUNX-2 mRNA 以及蛋白表达均较对照组显著增加, 表明瘦素能够促进 VICs 向成骨细胞转分化, 从而促进瓣膜钙化的发生及发展。

NF- κ B 是一种重要的信号通路分子, 参与了多种炎症反应相关的信号通路。NF- κ B 相关信号通路在 CAVD 的发生、发展过程中扮演了重要的角色^[14]。我们之前的研究在采用白介素 (IL)-18 干预 VICs 后发现 NF- κ B 相关信号通路被激活, 导致 VICs 发生向肌成纤维细胞转分化^[15]。在本研究中我们检测瘦素刺激后 NF- κ B 蛋白的表达, 结果发现瘦素刺激显著提高了 NF- κ B 蛋白的磷酸化表达。SN50 是 NF- κ B3 特异性抑制剂, 在本研究中, 我们在瘦素刺激的同时采用 SN50 干预 VICs, 发现 RUNX-2 蛋白表达受到明显的抑制, 进一步说明瘦素对于 VICs 表型变化的调控作用是通过 NF- κ B 相关的信号通路实现的。

综上所述, 本研究结果提示, 瘦素刺激能够促进 VICs 向成骨细胞表型分化, 从而促进主动脉瓣膜的钙化, 并且这种作用是通过激活 NF- κ B 相关信号通路实现的。因此, 可为探讨 CAVD 的发病机制提供进一步的线索, 同时为 CAVD 早期的药物治疗提供参考。

参考文献

- [1] Supino PG, Borer JS, Yin A. The epidemiology of valvular heart disease: an emerging public health problem [J]. *Adv Cardiol*, 2002, 39: 1-6.
- [2] Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study [J]. *Lancet*, 2006, 368 (9540): 1005-1011.
- [3] Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis [J]. *Lancet*, 2009, 373 (9667): 956-966.
- [4] Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: a review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: calcific aortic valve disease-2011 update [J]. *Circulation*, 2011, 124 (16): 1783-1791.
- [5] Yip CY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role

- in calcific aortic valve disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(3): 177-182.
- [6] Krawczynska A, Olczak E, Rembiszewska A, et al. Time-dependent supplementation of vitamin E influences leptin expression in the aortic layers of rats fed atherogenic diet[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(1): 33-39.
- [7] Liu GY, Liang QH, Cui RR, et al. Leptin promotes the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells from female mice by increasing RANKL expression[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(2): 558-567.
- [8] 吴自昌, 刘会良, 蔡杰. 80 岁以上老年人退行性心瓣膜病与主动脉钙化关系的探讨[J]. *实用老年医学*, 2012, 26(2): 169-170.
- [9] Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology[J]. *Recent Prog Horm Res*, 2004, 59: 287-304.
- [10] Basak S, Duttaray AK. Leptin induces tube formation in first-trimester extravillous trophoblast cells[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 164(1): 24-29.
- [11] Zeadin MG, Butcher MK, Shaughnessy SG, et al. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3 β [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(4): 924-930.
- [12] Liu GY, Liang QH, Cui RR, et al. Leptin promotes the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells from female mice by increasing RANKL expression[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(2): 558-567.
- [13] Monzack EL, Masters KS. Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison[J]. *J Heart Valve Dis*, 2011, 20(4): 449-463.
- [14] Zeng Q, Song R, Ao L, et al. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1580-1590.
- [15] Zhou J, Zhu J, Jiang L, et al. Interleukin 18 promotes myofibroblast activation of valvular interstitial cells[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221: 998-1003.

收稿日期: 2018-05-15 修回日期: 2018-06-05 编辑: 周永彬

(上接第 1318 页)

素可一定程度缓解 HCC 肝切除患者术后肝功能的损伤, 且术前间隔使用较连续使用方法对肝功能的改善效果更加明显, 但其是否通过激活抗炎通路、减轻炎症反应发生作用, 以及自噬及凋亡两者的关系, 是我们下一步需要研究的重点。

参考文献

- [1] Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, et al. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2077-2090.
- [2] Su YH, Lin SY, Song W, et al. DNA markers in molecular diagnostics for hepatocellular carcinoma[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14(7): 803-817.
- [3] Bruix J, Sherman M, AASLD. Management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1020-1022.
- [4] Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection—the good, bad and deadly[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 Suppl 1: 180-187.
- [5] Xiong X, Wu M, Zhang H, et al. Atg5 siRNA inhibits autophagy and enhances norcantharidin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(4): 1321-1328.
- [6] Wang Y, Shen J, Xiong X, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98834.
- [7] White JA, Redden DT, Bryant MK, et al. Predictors of repeat transarterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *HPB (Oxford)*, 2014, 16(12): 1095-1101.
- [8] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [9] 范上达, 邱宗祥, 潘冬平. 肝癌的综合治疗[J]. *中华消化外科杂志*, 2011, 10(4): 241-246.
- [10] 林福生, 沈世强, 闫瑞承, 等. 17- β 雌二醇对大鼠肝切除肝缺血再灌注损伤肝细胞凋亡和 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012, 18(3): 215-219.
- [11] Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, et al. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion[J]. *Hepatology*, 1996, 23(6): 1656-1663.
- [12] Vardanian AJ, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review[J]. *Mol Med*, 2008, 14(5/6): 337-345.
- [13] Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, et al. Autophagy in liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(6): 1123-1134.
- [14] Nivon M, Richet E, Codogno P, et al. Autophagy activation by NF κ B is essential for cell survival after heat shock[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6): 766-783.
- [15] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.

收稿日期: 2018-04-16 修回日期: 2018-06-02 编辑: 王国品