

瘦素对主动脉瓣膜间质细胞表型转化的影响

李明科,周景昕,吴延虎*

(南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨瘦素对主动脉瓣膜间质细胞(valvular interstitial cells, VICs)表型转化的影响,揭示瘦素在钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease, CAVD)发生发展中所扮演的角色。方法:胶原酶消化法分离并培养猪主动脉瓣膜间质细胞,采用含不同浓度的瘦素分别刺激细胞 24 h,检测细胞裂解液碱性磷酸酶(ALP)活性,并确定最佳刺激浓度。用最佳刺激浓度的瘦素刺激细胞 24 h,提取细胞 RNA 以及蛋白,通过 RT-PCR 以及 Western blot 分别测定肌动蛋白(α -SMA)、骨桥蛋白(OPN)的表达情况。结果:瘦素刺激导致 ALP 表达上调且最大刺激浓度为 100 ng/mL。相较于对照组,瘦素刺激组 OPN mRNA 及蛋白表达增高,而 α -SMA 表达无明显变化。结论:瘦素能够诱导 VICs 向成骨细胞分化,从而促进 VICs 钙化。

[关键词] 瘦素;主动脉瓣膜间质细胞;骨桥蛋白;肌动蛋白;碱性磷酸酶

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-976-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170811

Effects of leptin on aortic valve interstitial cells

Li Mingke, Zhou Jingxin, Wu Yanhu*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of leptin on aortic valvular interstitial cells (VICs) transdifferentiation and reveal the role of leptin in the development of calcific aortic valve disease (CAVD). **Method:** Porcine aortic VICs were separated and cultured via collagenase digestion. The VICs were incubated with leptin in different concentrations for 24 hours and the best stimulation concentration was determined by detecting ALP activity in the cell lysate. After incubated into optimal stimulation concentration for 24 hours, mRNA and protein expressions of α -SMA and OPN were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results:** Treatment with leptin enhanced the ALP expression of VICs and the optimal concentration was 100 ng/ml. Leptin treatment significantly promoted the mRNA and protein expression of OPN while α -SMA was not changed. **Conclusion:** Leptin can promote VICs calcification through inducing VICs transdifferent into osteoblast-like cells.

[Key words] leptin; aortic valvular interstitial cells; OPN; α -SMA; ALP

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):976-979]

钙化性主动脉瓣膜病(calcific aortic valve disease, CAVD)在心脏瓣膜病中的发病率越来越高,其临床发病率随年龄增加而升高^[1]。现在认为钙化性主动脉瓣狭窄是一种主动调节的疾病,其主要病理基础就是主动脉瓣膜钙化以及退行性病变^[2],同时有研究指出 CAVD 的病理过程部分类似于动脉粥样硬化^[3]。有证据表明瓣膜间质细胞(valvular interstitial cells, VICs)在瓣膜钙化的过程中扮演了重要角色,天然健康的 VICs 的表型类似于成纤维细

胞(fibroblast),而当瓣膜受到病理性刺激时,其表型可向肌成纤维细胞(myofibroblast)以及成骨细胞(osteoblast)转化,分别表达成肌标志物如 α -肌动蛋白(α -SMA)及成骨标志物如骨桥蛋白(OPN)等^[4]。瘦素于 1994 年被发现并命名,是由脂肪细胞分泌的蛋白质类激素。研究表明,其在心肌、乳腺、骨骼肌、肺、胃黏膜等组织中均有不同程度的表达。近年的研究发现,瘦素能促进平滑肌细胞的增殖和迁移,在动脉粥样硬化的发生、发展过程中也起重要作用^[5]。研究发现,在 CAVD 患者主动脉瓣叶中瘦素表达增加^[6]。但瘦素在主动脉瓣钙化过程中所起作用目前尚不明确。

[基金项目] 江苏省六大人才高峰(2012-WSW-108)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:wuyanhu@njmu.edu.cn

本研究提出假说,瘦素能够促进 VICs 表型发生转化从而导致瓣膜钙化的发生发展。本研究通过测定瘦素干预后 VICs 碱性磷酸酶(ALP)含量,并利用 RT-PCR 及 Western blot 技术测定瘦素刺激下 VICs 细胞中 α -SMA、OPN 在 mRNA 以及蛋白水平的表达,旨在阐明瘦素在钙化性主动脉瓣疾病中的作用,为钙化性主动脉瓣疾病的治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

主动脉瓣膜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 (Gibco 公司,美国),重组猪瘦素(recombinant porcine leptin,Prospec 公司,以色列),I 型胶原酶(Sigma 公司,美国),ALP 活性检测试剂盒(杭州碧云天公司)。抗体: α -SMA 抗体(Sigma 公司,美国),OPN 抗体(Lifespan 公司,美国)。内参 GAPDH、OPN、 α -SMA 引物(南京锐真生物技术有限公司)。全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物技术股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 瓣膜细胞的分离与培养

取刚处死成年健康生猪,完整取下主动脉根部,组织剪纵行打开猪升主动脉根部,剪下主动脉瓣膜,反复冲洗后放入含双抗的冰 PBS 溶液中,置于冰盒,迅速带回实验室。漂洗完的瓣膜置于 0.1%胶原酶溶液中,37 °C 放置 15 min。用无菌棉签尽可能擦去表面的内皮细胞,再次将瓣膜放入 0.1%胶原酶溶液内,37 °C 孵箱过夜。取出瓣膜,离心 2 000 r/min 5 min,加入 10 mL 高糖 DMEM 培养基(DMEM+10% FBS+双抗)重悬,转移至培养皿,置于 5%CO₂ 37 °C 孵箱,次日换液。此后每 2~3 d 换液 1 次,待细胞在 90%融合时,传代。

1.2.2 ALP 活性检测

取 P2、P3 原代细胞,接种于 6 孔板中。待 80%左右融合时,采用无血清的培养基饥饿 24 h。分别用含 0、25、50、100、200、400 ng/mL 瘦素的高糖 DMEM 培养基干预 24 h,提取蛋白。按 ALP 检测试剂盒说明书所示方法操作,用分光光度仪检测波长 520 nm 处的吸光度值,分别计算各瘦素浓度干预下 ALP 活性。

1.2.3 RT-PCR 检测

细胞接种于 6 孔板。对照组($n=3$)用含 10%FBS

DMEM 培养,实验组($n=3$)用含最佳刺激浓度瘦素的 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 RT-PCR 检测 α -SMA、OPN 的 mRNA 表达水平。逆转录反应体系为 10 μ L 体系。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 7 μ L,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。PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primers and protocols for RT-PCR

基因	序列(5'→3')
OPN	上游:GAGCAAACAGACGATGTGGA
	下游:GACCAGCTCATCGGATTCAT
α -SMA	上游:CAGCCAGGATGTGTGAAGAA
	下游:TCACCCCTGATGTCTAGGA
GAPDH	上游:AATGGGGTTCAACGGGTTAC
	下游:TAGAGGGACAAGTGGCGTTC

1.2.4 Western blot 检测

实验分组以及刺激方案同 RT-PCR 检测。细胞总蛋白采用 BCA 法进行蛋白定量。经 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,TBST 洗膜 3 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。发光试剂显色,凝胶成像系统扫描分析结果。

1.3 统计学方法

各实验独立重复 3 次以上,数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS17.0 进行统计分析,组间比较采用方差分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

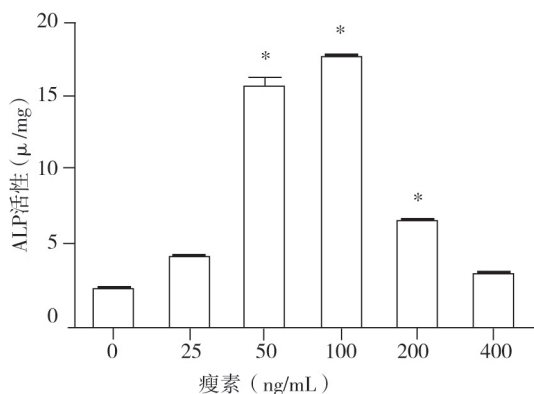
2.1 瘦素对 VICs ALP 活性的影响

瘦素刺激显著增加 ALP 的活性,刺激浓度在 50、100 及 200 ng/mL 时差异有统计学意义 ($P<0.05$,图 1),且在瘦素浓度为 100 ng/mL 时效果最为明显,因此确定 100 ng/mL 为后续实验的最佳刺激浓度。

2.2 瘦素对 VICs α -SMA、OPN mRNA 表达的影响

用瘦素浓度为 100 ng/mL 的高糖 DMEM 培养基干预 VICs 细胞 24 h 后,RT-PCR 结果显示实验组 OPN mRNA 表达较对照组显著增加($P<0.05$),实验组 α -SMA mRNA 的表达较对照组有所增加,但未达

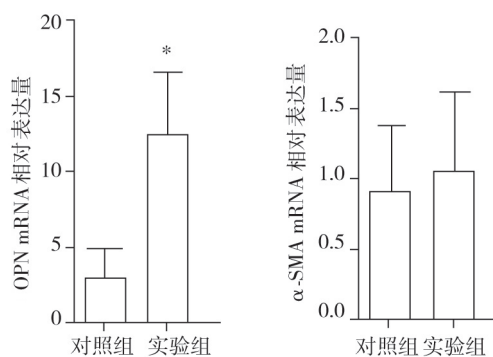
到统计学意义 ($P>0.05$, 图 2)。



与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度瘦素对 VICs ALP 活性影响

Figure 1 Effects of different leptin level on ALP activity of VICs



与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 2 100 ng/mL 瘦素对 OPN、α-SMA mRNA 的表达影响

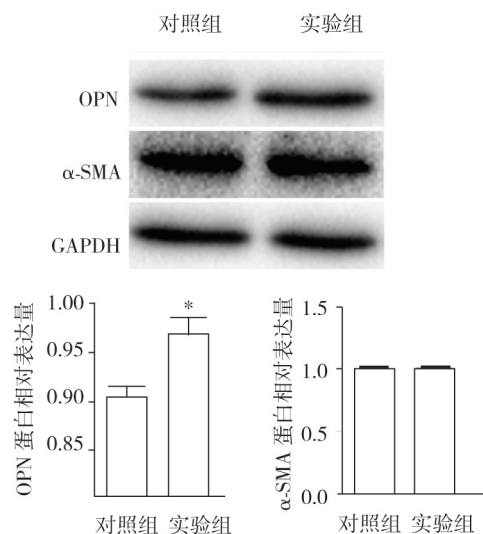
Figure 2 The expression of OPN and α-SMA mRNA without and with 100 ng/mL leptin

2.3 瘦素对 VICs OPN、α-SMA 蛋白表达的影响

瘦素刺激 VICs 后, 其 OPN 蛋白表达较对照组明显上调, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 α-SMA 蛋白表达未见明显差异 ($P>0.05$, 图 3)。

3 讨论

瘦素是一种多肽激素, 主要在白色脂肪组织中表达, 通过与瘦素受体 (Ob-R) 结合发挥作用, 瘦素具有广泛的生物学效应, 主要作用于下丘脑的代谢调节中枢, 发挥抑制食欲, 减少能量摄取, 增加能量消耗, 抑制脂肪合成等作用^[7]。瘦素参与神经内分泌疾病、炎症反应、免疫调节、呼吸疾病、肥胖症等多种疾病的发生与发展, 也在心血管疾病的发生、发展过程中起着重要作用。最近研究表明, 瘦素具有交感活性、升压作用、调节血管功能、胰岛素抵抗、促血小板



与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 3 100 ng/mL 瘦素对 OPN 与 α-SMA 蛋白表达的影响

Figure 3 The expression of OPN and α-SMA protein without and with 100 ng/mL leptin

聚集、促血管生成等作用^[8]。Parhami 等^[9]的研究表明, 给予外源性瘦素刺激能够直接促进血管细胞钙化; 此外, 瘦素能调控血管平滑肌细胞发生钙化, 且 Zeadin 等^[10]首次证实了在动物体内瘦素能促进血管钙化。Liu 等^[11]证明了瘦素能够上调核因子 (NF)-κB 配体的受体激动剂 (receptor activator of NF-κB ligand, RANKL) 的表达从而促进小鼠钙化型血管平滑肌细胞钙化; 瘦素还能够通过抑制血管平滑肌细胞的糖原合成酶激酶 (GSK)-3β 促进其向成骨细胞分化和矿化^[12]。本研究采用瘦素刺激 VICs, 发现其 ALP 表达显著上调, 提示瘦素能够促进 VICs 发生钙化。

主动脉瓣膜中主要存在两种细胞类型, 分别是瓣膜内皮细胞 (valvular endothelial cells, VECs) 以及 VICs。其中 VICs 是主动脉瓣膜中最主要的细胞类型, 近年来多项研究表明 VICs 表型转化在钙化性主动脉瓣疾病中扮演了重要角色。有研究指出脂多糖 (LPS) 能够刺激 VICs 表达多种炎症因子以及成骨介质, 而二聚糖能够通过激活 Toll 样受体促进瓣膜间质细胞向成骨转化并出现钙化^[13]。本研究使用适当浓度的瘦素刺激 VICs 后, 其 OPN mRNA 及蛋白表达增加, 提示瘦素刺激可诱导 VICs 表型向成骨细胞转化。另外研究发现, 转化生长因子 (TGF)-β1 能够诱导 VICs 向肌成纤维细胞转化^[14], 使得 VICs 细胞收缩力增强, 增加了细胞间叠加, 促进钙化结节的产生, 而 5-羟色胺受体 (5-HT2B) 能够抑制 TGF-β1 信号通路, 从而抑制 VICs 向肌成纤维细胞转化^[15]。

本研究小组先前的研究证实了白介素 18 能够诱导 VICs 向肌成纤维细胞转化^[16],而本课题组目前的研究发现 α -SMA mRNA 及蛋白表达无明显变化,表明瘦素并不能诱导 VICs 向肌成纤维细胞转化。有学者认为 VICs 向肌成纤维细胞转化可能是其向成骨转化的一个中间步骤,但 Monzack 等^[17]的研究发现 VICs 可直接向成骨细胞转化,而 α -SMA 表达并没有上调,这与本研究结果是一致的。

综上所述,本研究证明了瘦素能够促进 VICs 向成骨细胞转化,并使其 ALP 表达增加,最终导致钙化的产生。也为进一步证实瘦素在 CAVD 中的作用以及 CAVD 发生、发展的分子机制提供新的理论依据。然而钙化是一个非常复杂的病理过程,关于瘦素调控主动脉瓣膜间质细胞钙化的机制,尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016,133(4):e38-e360
- [2] 袁昭顺,冯翔,廖晓波. 主动脉瓣钙化性狭窄的异位钙化机制[J]. *国际心血管病杂志*,2014,41(2):69-71
- [3] Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2007,18(5):483-491
- [4] Yip CY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease[J]. *Cardiovasc Pathol*,2011,20(3):177-182
- [5] Shehzad A, Ha T, Subhan F, et al. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases[J]. *Eur J Nutr*, 2011,50(3):151-161
- [6] 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
- [7] Vauthier V, Derviaux C, Douayry N, et al. Design and validation of a homogeneous time resolved fluorescence based leptin receptor binding assay[J]. *Anal Biochem*,2013,436(1):29-35
- [8] Basak S, Duttaroy AK. Leptin induces tube formation in first-trimester extravillous trophoblast cells[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*,2012,164(1):24-29
- [9] Parhami F, Tintut Y, Ballard A, et al. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin[J]. *Circ Res*,2001,88(9):954-960
- [10] Zeadin M, Butcher M, Werstuck G, et al. Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(12):2069-2075
- [11] 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
- [12] 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)-3beta[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012,425(4):924-930
- [13] Song R, Zeng Q, Ao L, et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2012,32(11):2711-2720
- [14] Walker GA, Masters KS, Shah DN, et al. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease[J]. *Circ Res*,2004,95(3):253-260
- [15] Hutcheson JD, Ryzhova LM, Setola V, et al. 5-HT(2B) antagonism arrests non-canonical TGF-beta1-induced valvular myofibroblast differentiation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012,53(5):707-714
- [16] 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
- [17] 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

[收稿日期] 2017-01-23