

· 基础研究 ·

GLP-1 抑制主动脉瓣膜间质细胞钙化

戴亚伟,周景昕,韩旭,唐义虎,李明科,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:探讨胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)对主动脉瓣间质细胞(valve stromal cells, VIC)钙化的影响,揭示GLP-1在钙化性主动脉瓣疾病(calcified aortic valve disease, CAVD)发生发展中的保护作用及作用机制。方法:胶原酶消化法分离并培养猪主动脉瓣膜间质细胞,用高钙、高磷法刺激建立主动脉瓣间质细胞钙化模型。采用不同浓度的GLP-1分别干预VICs,通过检测细胞裂解液中钙离子浓度确定最佳浓度。用最佳干预浓度的GLP-1刺激细胞,提取RNA及蛋白,通过RT-PCR以及Western blot分别测定骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx-2)以及相关信号通路p65蛋白的表达情况。结果:GLP-1作用导致细胞裂解液钙离子浓度降低且最大刺激浓度为200 ng/mL。相比于对照组,GLP-1干预组OPN、Runx-2 mRNA和蛋白表达都降低,p65蛋白表达也降低。结论:GLP-1能够通过抑制p65的表达进而抑制VICs的钙化及其成骨表型分化。

[关键词] 胰高血糖素样肽-1;主动脉瓣间质细胞;骨桥蛋白;Runt相关转录因子;钙离子浓度;p65

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-664-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190507

GLP-1 inhibits calcification of aortic valve interstitial cells

Dai Yawei, Zhou Jingxin, Han Xu, Tang Yihu, Li Mingke, Wu Yanhu*

Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on phenotypic transformation of aortic valve stromal cells (VIC), suggesting the role of GLP-1 in the development of calcified aortic valve disease (CAVD) and the mechanism of action. **Methods:** The interstitial cells of porcine aortic valve were isolated and cultured by collagenase digestion. The calcification model of aortic valve interstitial cells was established by high calcium and phosphorus stimulation. The calcification model was treated by different concentrations of GLP-1. The best concentration of GLP-1 was determined by the calcium ion concentration in the cell lysate. The optimal concentration of GLP-1 was used to stimulate the cells, and then RNA and cell proteins were extracted. The expression of osteopontin (OPN), runt-related transcription factor 2 (Runx-2) and related signaling pathway p38 were determined by RT-PCR and Western blot. **Results:** GLP-1 reduced the concentration of calcium ion in cell lysate and the maximum stimulation concentration of GLP-1 was 200 ng/mL. Compared with the control group, mRNAs and proteins of OPN, Runx-2 in GLP-1 intervention group decreased, and the expression of p65 protein also decreased. **Conclusion:** GLP-1 can inhibit the calcification and osteogenic phenotype differentiation of VICs by inhibiting the expression of p65.

[Key words] glucagon like peptide-1; valve stromal cell; osteopontin; runt-related transcription factor 2; calcium ion concentration; p65

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05):664-667]

主动脉瓣疾病是发达国家心血管疾病发病的

主要原因^[1],随着人们预期寿命的不断增加,其发病率会越来越高^[2]。过去认为钙化性主动脉瓣疾病(calcified aortic valve disease, CAVD)是一种随着年龄增长而产生的退行性病变,但现在认为这是一种主动调节的疾病,是由细胞和蛋白介导的一种主动

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81700340);南京市科技局项目(201715002)

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

和渐进性的调节过程,学者研究后认为CAVD病理过程与动脉粥样硬化有相似之处,炎症、氧化应激、机械应力等因素在其中扮演了重要的角色^[3]。目前对于CAVD发病机制的研究逐渐成为热点,越来越多的证据表明主动脉瓣间质细胞(valve stromal cells, VIC)在瓣膜钙化的过程中扮演了重要的角色。健康的VIC表型类似于成纤维细胞(fibroblast),而当瓣膜受到病理性刺激时,其表型可向成骨细胞转化,表达成骨表面标志如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、Runx相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx-2)等,OPN、RUNX-2是几乎在所有钙化中都会表达的典型钙化分子^[4]。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是肠上皮L细胞分泌的一种含有30个氨基酸小分子多肽,具有促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素的释放、减少胰岛β细胞凋亡等作用,对于维持机体糖代谢稳态具有重要作用,是目前公认的治疗糖尿病理想药物^[5]。有研究表明GLP-1能够激活相关通路,调节心肌代谢,降低心肌再灌注损伤,抑制心肌细胞的凋亡,改善心脏功能^[6]。但GLP-1对于主动脉瓣钙化的影响目前尚不明确,因此,本研究采用GLP-1干预VIC钙化模型,检测细胞裂解液中钙离子的浓度以及OPN、Runx-2的表达情况,旨在阐明GLP-1对于VIC钙化以及成骨表型分化的抑制作用,为CAVD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幼年家猪,高糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、PBS缓冲液、QuantiChrom™ Calcium Assay Kit(Quanti Chrom公司,美国),青/链霉素(杭州碧云天公司),GLP-1(Sigma公司,美国)。Runx-2抗体(Abcam公司,美国),OPN抗体(Lifespan公司,美国),GAPDH抗体(CST公司,美国)。内参GAPDH、OPN、Runx-2引物(南京锐真生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 猪主动脉瓣间质细胞的提取与培养

清洗猪,固定四肢后,颈动脉放血,在主动脉根部将主动脉三叶瓣膜从根部剪出,放入预冷无菌的PBS中暂存。把瓣膜放入有0.1%胶原酶消化液的6 cm培养皿中,放入温箱中消化15 min。用细胞刮轻轻刮去瓣膜上皮细胞,再次将瓣膜放入胶原酶消化液中,放入摇床(37℃,转速200 r/min),消化3 h。取

出瓣膜,将消化液移至离心管中,离心1 000 r/min 3 min,弃上清,加入10 mL高糖DMEM培养基(DMEM+15%FBS+双抗),重悬,转移至培养瓶中,置于37℃5%CO₂培养箱中,次日换液。此后每隔2 d换液,待细胞达90%融合时进行传代,后续实验取第4~5代细胞进行。

1.2.2 钙浓度测定

细胞接种于12孔板中。待90%左右融合时,分别用含0、25、50、100、200、400 ng/mL GLP-1的高糖DMEM,高钙、高磷培养基干预24 h。每孔加入500 μL 0.6 mol/L HCl,4℃摇床24 h。按钙离子检测试剂盒说明书所示方法将样品与试剂按一定比例混匀,酶标检测612 nm处的吸光度,算出绝对钙离子浓度。然后提取蛋白,按BCA法测定蛋白浓度。相对钙浓度值=绝对钙浓度/蛋白浓度。

1.2.3 RT-PCR检测

细胞接种于6孔板中。对照组($n=3$)用含15% FBS DMEM培养,实验组($n=3$)用含有200 ng/mL GLP-1的15%FBS DMEM培养。两者均刺激24 h后,采用TRIzol试剂提取细胞总RNA。通过RT-PCR检测OPN、Runx-2的mRNA表达水平。逆转录采用10 μL反应体系。反应条件为:42℃15 min,85℃5 s,4℃保存。PCR扩增体系为20 μL(cDNA 1 μL,上下游引物各1 μL,去离子水10 μL,cDNA模板1 μL,ROX 7 μL);反应条件:95℃,15 s,60℃,1 min,重复40个循环。PCR引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primers for RT-PCR

基因	序列(5'→3')
OPN	上游:GAGCAAACAGACGATGTGGA
	下游:GACCAGCTCATCGGATTCAT
Runx-2	上游:GACTGTGGTTACCGTCATGGC
	下游:CTTGGTTTTTCATAACAGCGGA
GAPDH	上游:AATGGGGTTCAACGGGTTAC
	下游:TAGAGGGACAAGTGGCGTTC

1.2.4 Western blot检测

实验组与对照组设计与RT-PCR检测相同。采用BCA法测定蛋白浓度进行蛋白定量检测。经过电泳,转膜,将蛋白转到PVDF膜上。室温用脱脂奶粉溶液封闭2 h。加入一抗,4℃孵育过夜。0.2% TBST洗一抗4次。加入二抗,室温孵育1.5 h。加入显影液,凝胶成像系统扫描分析结果。

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,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析及两两比较LSD-*t*检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GLP-1对VIC相对钙离子浓度的影响

GLP-1干预显著降低了VIC相对钙离子浓度,刺激浓度在50、100、200、400 ng/mL时差异有统计学意义($P < 0.05$,图1),且GLP-1浓度在200 ng/mL效果最明显,因此确定200 ng/mL为后续实验的最佳刺激浓度。

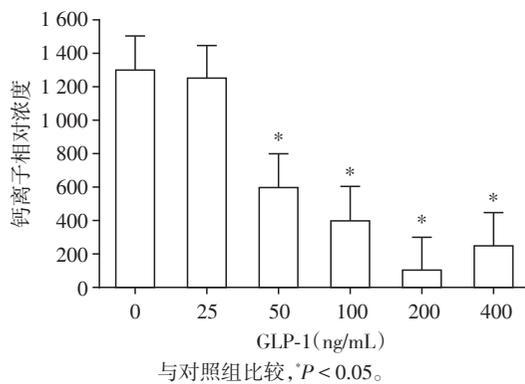


图1 不同浓度GLP-1对VIC钙离子浓度的影响

Figure 1 Effects of different GLP-1 level on Ca²⁺ of VIC

2.2 GLP-1对OPN、Runx-2的mRNA表达的影响

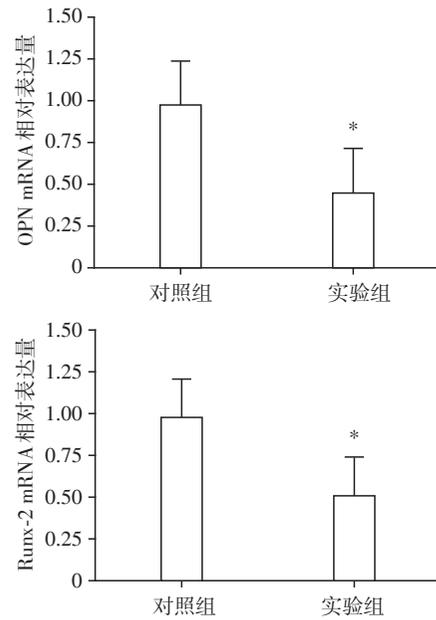
用200 ng/mL GLP-1的高糖DMEM培养基处理VIC 24 h, RT-PCR结果显示,实验组OPN、Runx-2 mRNA的表达较对照组显著降低($P < 0.05$,图2)。

2.3 GLP-1对OPN、Runx-2蛋白表达的影响

GLP-1干预VIC后,其OPN、Runx-2蛋白表达较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

2.4 GLP-1对p65蛋白表达的影响

GLP-1干预细胞后,p65蛋白表达较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图4)。



与对照组比较, $P < 0.05$ 。

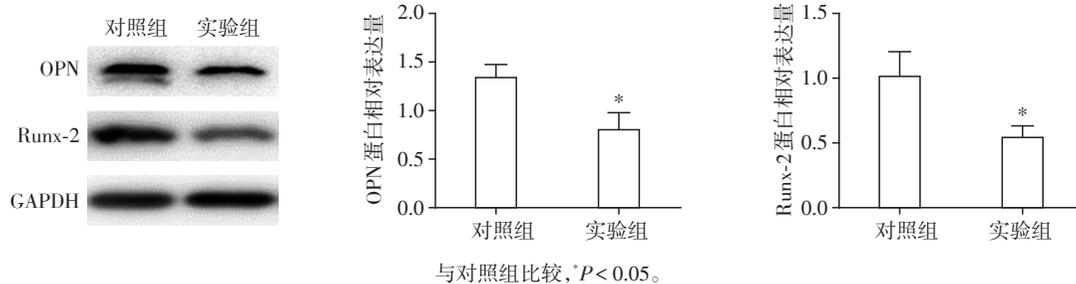
图2 GLP对OPN和RUNX-2 mRNA的表达

Figure 2 The expression of OPN and RUNX-2 mRNA in each group

3 讨论

GLP-1主要是和GLP-1受体(GLP-1R)相互结合发挥作用。GLP-1R不仅在胰腺有表达,还广泛分布于胰腺外的多种组织器官,如心脏、脑、肝脏、胃肠道、肾脏、肺、中枢神经系统等^[7]。GLP-1R分布的广泛性是能发挥多种生物学效应的基础。最近有研究表明,GLP-1类似物利拉鲁肽能够抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)向成骨细胞分化,从而抑制血管钙化^[8]。本实验采用GLP-1刺激VIC,发现细胞裂解液中钙离子浓度显著下调,提示GLP-1能够抑制VIC的钙化。

主动脉瓣膜中主要存在两种细胞,一种是主动脉瓣内皮细胞(valvular endothelial cell, VEC),另一种则是VIC,后者具有成纤维细胞、平滑肌细胞和肌



与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图3 GLP-1对OPN和Runx-2蛋白表达的影响

Figure 3 The expression of OPN and Runx-2 protein in each group

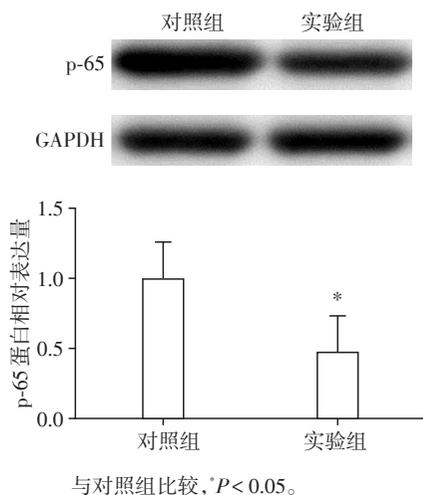


图4 GLP-1对p65蛋白表达的影响

Figure 4 The expression of p65 protein in each group

成纤维细胞的特征^[9]。当VIC受到刺激时,表型正常的成纤维细胞就会被激活,表现为肌成纤维细胞表型,这时VIC便具有了收缩功能和合成新蛋白质的功能^[10]。主动脉瓣钙化疾病的特点主要是一些钙化的结节相互融合,从而影响主动脉瓣膜组织的功能。这些变化一般最主要开始于主动脉瓣膜的纤维层,这种频繁地向成骨细胞的转变,也被称为骨性化生^[11]。关于钙化结节形态形成,目前比较被认同的是骨化理论。VIC的骨化是形成钙化结节的关键。研究表明二聚糖能够通过激活Toll样受体促进VIC向成骨转化并出现钙化。Arakawa等^[12]采用GLP-1R激动剂作用于小鼠,结果发现GLP-1R激动剂能够抑制单核/巨噬细胞在主动脉瓣表面聚集,减轻瓣膜钙化病变。本研究采用适当浓度GLP-1来干预VIC,能够显著抑制OPN、Runx-2 mRNA以及蛋白表达,提示GLP-1可能通过抑制VIC向成骨细胞转化,抑制钙化结节的产生,进而抑制主动脉瓣钙化。而对于这种现象产生的机制,本文对于p65这条经典的炎症转导通路进行了研究,发现GLP-1处理后,p65蛋白表达较对照组明显降低,提示GLP-1是通过抑制p65的表达而抑制细胞钙化。同时也间接说明主动脉瓣膜的钙化和炎症因子的表达是密切相关的。

综上所述,本研究证明了GLP-1能够通过抑制p65的表达进而抑制VIC的钙化及其成骨表型分化,降低细胞中钙离子浓度,为明确GLP-1在CAVD所起的作用提供了新的理论依据。然而主动脉瓣

钙化是一个非常复杂的过程,关于GLP-1抑制VICs钙化的机制还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2012, 125 (1) : e2-220
- [2] 李明科,周景昕,吴延虎. 瘦素对主动脉瓣膜间质细胞表型转化的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017,37(8):976-979
- [3] Sathyamurthy I, Alex S. Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis?[J]. *Indian Heart J*, 2015, 67(5):503-506
- [4] Yu C, Li L, Xie F, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1):168-179
- [5] Hansen M, Tencerova M, Frolich J, et al. Effects of gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on bone cell metabolism [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122 (1) : 25-37
- [6] Li J, Zheng J, Wang S, et al. Cardiovascular benefits of native GLP-1 and its metabolites: An indicator for GLP-1-therapy strategies[J]. *Front Physiol*, 2017, 8(1): 15
- [7] Sandoval DA, D' Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(2):513-548
- [8] Zhan JK, Wang YJ, Wang Y, et al. The protective effect of GLP-1 analogue in arterial calcification through attenuating osteoblastic differentiation of human VSMCs[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 189(2): 188-193
- [9] Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology[J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(5): 1407-1418
- [10] Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell[J]. *J Biomech*, 2010, 43(1): 146-155
- [11] Xu R, Zhao M, Yang Y, et al. MicroRNA-449c-5p inhibits osteogenic differentiation of human VICs through Smad4-mediated pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):8740
- [12] Arakawa M, Mita T, Azuma K, et al. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4[J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 1030-1037

[收稿日期] 2018-11-13