

# 体外培养高糖、高脂喂养大鼠主动脉平滑肌细胞钙化的研究

王晓来 宋春青 邵海琳 徐东红 尚晓静 郝兆虎

**【摘要】 目的** 检测高糖、高脂喂养 Goto-Kakizaki (GK) 糖尿病大鼠主动脉平滑肌细胞 (SMCs) 的血管钙化指标, 探讨糖尿病血管钙化的相关机制。**方法** 高糖、高脂喂养 GK 及 Wistar 大鼠 2 周, 同时分离培养两组大鼠的主动脉 SMCs, Wistar 大鼠 SMCs 作为对照。通过细胞计数法观察细胞生长状况, 以甲基百里香酚蓝比色法测定两组大鼠细胞层及培养上清中钙的含量, 实时定量 PCR 检测两组细胞碱性磷酸酶 (ALP)、骨桥蛋白 (OPN)、核心结合因子  $\alpha$ -1 (Cbf $\alpha$ -1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的基因表达。**结果** 与 Wistar 大鼠 SMCs 相比, GK 大鼠 SMCs 生长速度明显缓慢 ( $F=363.392, P<0.05$ ); 细胞层钙含量  $[(0.56 \pm 0.22) \text{ vs. } (0.39 \pm 0.09), t=2.47, P<0.05]$  明显增加, 培养上清中钙含量  $[(0.82 \pm 0.22) \text{ vs. } (1.20 \pm 0.17), t=-22.573, P<0.05]$  明显减少。GK 大鼠 SMCs 中 ALP ( $t=12.963, P<0.05$ )、OPN ( $t=8.305, P<0.05$ ) 及 Cbf $\alpha$ -1 ( $t=10.109, P<0.05$ ) 的基因表达增加, 同时  $\alpha$ -SMA ( $t=-8.219, P<0.05$ ) 的基因表达减少。**结论** 高糖、高脂喂养的 GK 糖尿病大鼠的主动脉平滑肌细胞易发生钙化。

**【关键词】** 细胞钙化; 主动脉平滑肌细胞; Goto-Kakizaki 大鼠; 糖尿病

## Calcification of aortic smooth muscle cells from high-sugar and high-fat diet rat cultured *in vitro*

Wang Xiaolai, Song Chunqing, Shao Hailin, Xu Donghong, Shang Xiaojing, Hao Zhaozhu. Department of Endocrinology, The Fourth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanisms of diabetic vascular calcification by examining the markers related to vascular calcification of aortic smooth muscle cells (SMCs) isolated from the thoracic aortas of Goto-Kakizaki (GK) rats fed with high-sugar and high-fat diet. **Methods** GK and Wistar rats were fed with high-sugar and high-fat diet for two weeks. SMCs were isolated from GK rats and Wistar rats simultaneously, and SMCs from Wistar rats were used as control. The growth of SMCs was observed by cell counting. The calcium contents in SMCs layer and supernatant were measured by methyl thymol blue method. Expression of alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), core binding factor  $\alpha$ -1 (Cbf $\alpha$ -1),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with SMCs from Wistar rats, SMCs from GK rats grew slowly significantly ( $F=363.392, P<0.05$ ), the calcium contents was significantly increased in the cells' layer  $[(0.56 \pm 0.22) \text{ vs. } (0.39 \pm 0.09), t=2.47, P<0.05]$ , and was significantly reduced in the supernatant  $[(0.82 \pm 0.22) \text{ vs. } (1.20 \pm 0.17), t=-22.573, P<0.05]$  in GK rats group. The expression of ALP ( $t=12.963, P<0.05$ ), OPN ( $t=8.305, P<0.05$ ), Cbf $\alpha$ -1 ( $t=10.109, P<0.05$ ) in SMCs from GK rats increased, while expression of  $\alpha$ -SMA decreased ( $t=-8.219, P<0.05$ ). **Conclusions** SMCs from high-sugar and high-fat fed GK diabetic rats tend to appear calcification.

**【Key words】** Cell calcification; Aortic smooth muscle cells; Goto-Kakizaki rat; Diabetes mellitus

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 145-148)

既往曾经认为血管钙化是被动的、衰退的过程, 现在认为其是一种病理生理过程, 同时具有胚胎骨形成的一些特点, 是主动的、可以调节的。血管钙化可以通过高血压、动脉狭窄、心脏肥大、心肌梗死、

肢端缺血、充血性心力衰竭、危害血管结构完整性来降低大动脉和动脉的弹性, 并可以影响循环系统血流动力学, 增加心血管疾病的发病率和死亡率<sup>[1-3]</sup>。多项研究显示, 糖尿病患者冠状动脉钙化的发生率增加, 并且与已知心血管疾病危险因素及胰岛素抵抗相关<sup>[4-8]</sup>。

Goto-Kakizaki (GK) 大鼠是一种自发性 2 型糖

尿病动物模型。本研究旨在通过原代培养高糖、高脂喂养 GK 大鼠主动脉平滑肌细胞(SMCs),并以 Wistar 大鼠主动脉 SMCs 作为对照,初步探讨 SMCs 的钙化相关指标。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 13 周龄雄性 Wistar 大鼠和 GK 大鼠购自上海斯莱克动物中心。高糖、高脂饲料购自江苏省协同医药生物工程有限公司,成分为基础饲料 59.8%,猪油 16%,蔗糖 20%,蛋黄 3%,胆固醇 1%,胆盐 0.2%。高糖型 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。青霉素、链霉素为山东鲁抗医药股份有限公司产品。细胞钙含量试剂盒购自南京建成公司。引物由捷瑞生物技术有限公司合成,dNTP、AMV 反转录酶、SYBRGreen 预混试剂盒购自日本 Takara 公司。RNA 提取试剂即 Trizol 和胰蛋白酶为 Sigma 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 13 周龄雄性 Wistar 和 GK 大鼠经过适应性喂养** 1 周后给予高糖、高脂饲料喂养 2 周。

**1.2.2 细胞培养及鉴定** 采用组织贴块法分离培养原代 SMCs,培养液:DMEM 培养基,含青霉素 100 U/ml,链霉素 0.1 mg/ml,10%胎牛血清。培养条件:37℃恒温培养箱内(5% CO<sub>2</sub>)。应用免疫组化 SP 法分析其  $\alpha$ -SMA 抗原的表达以鉴定 SMCs。

**1.2.3 细胞生长曲线的测定(细胞计数法)** 将生长良好且接近融合的细胞(第 3 代)采用胰酶消化,离心后弃去旧培养基后,更换为 4~5 ml 的新鲜培养基,然后制成细胞悬液进行计数。根据细胞计数的结果按照  $5 \times 10^4$ /ml 进行细胞传代培养,接种细胞 21 瓶。24 h 后开始细胞计数,以后每间隔 24 h 再计数 1 次,每次取出 3 瓶细胞,分别进行计数,计算平均值,连

续计数 7 d。根据细胞计数结果,以单位细胞数为纵坐标,以时间为横坐标绘制细胞生长曲线。

**1.2.4 SMCs 钙含量测定** 按照  $2 \times 10^4$ /ml 将 SMCs 接种于 6 孔板,培养至 30%~40%融合后,再培养 6 d,用 PBS 液洗涤细胞 3 次后,加入 0.6 mol/L 稀盐酸在 37℃脱钙 24 h。采用甲基百里香酚蓝比色法测定盐酸悬液中钙含量。脱钙后的细胞用 PBS 液洗涤 3 次后,用 0.1 mmol/L NaOH/0.1%SDS 溶解细胞,以 BCA 法测定蛋白定量,并以蛋白定量来标化钙含量。

**1.2.5 细胞培养上清液中钙含量测定** 测定各组细胞内钙含量的同时,留取细胞培养上清液,应用甲基百里香酚蓝比色法测定细胞培养上清液的钙含量。

**1.2.6 实时定量 PCR 分析** Trizol 提取细胞 RNA,按照 Prime Script RT reagent 试剂盒说明书,逆转录合成 cDNA。应用特异性引物对逆转录产物进行定量 PCR。扩增反应条件:95℃5 s,60℃20 s,35 个循环。以 GAPDH 为内标,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对目的基因进行定量分析。 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 实验组} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 对照组}$ 。用于基因序列扩增的引物序列,见表 1。

**1.3 统计学处理** 所有数据用 SPSS13.0 统计软件进行处理。计量资料以均数  $\pm$  标准差表示,两组间均数比较,如方差齐采用 *t* 检验;如方差不齐采用 *t'* 检验,两组细胞生长曲线的比较采用重复测量资料的方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫细胞化学法鉴定 Wistar 大鼠和 GK 大鼠 SMCs** 原代培养的细胞经特异的  $\alpha$ -SMA 免疫细胞化学染色后,细胞浆着色,呈阳性反应,在高倍镜下可见胞浆内大量棕色、与细胞长轴平行的纤维细丝,

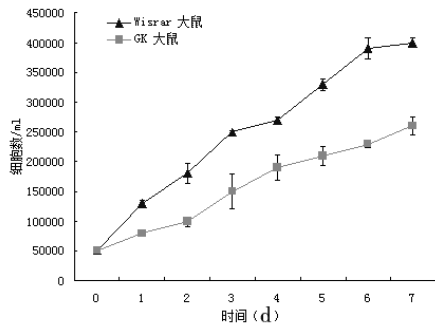
表 1 用于基因序列扩增的引物序列

基因		上游引物	下游引物	退火温度(℃)	产物(bp)	序列号
GAPDH	上游引物	5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3'		60	71	NM_017008.3
	下游引物	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'				
ALP	上游引物	5'-TCCCAGCTTCTAGCCTTGGA-3'		60	108	J03572
	下游引物	5'-CAGCCCGCTCTGCTATGG-3'				
OPN	上游引物	5'-CTGCCAGCACACAAGCAGAC-3'		60	145	M14656
	下游引物	5'-TCTGTGGCATCGGGATACTG-3'				
$\alpha$ -SMA	上游引物	5'-GCTGCTCCAGCTATGTGTGAAGAG-3'		60	175	NW_001084774.1
	下游引物	5'-CCAGTTGGTGATGATGCCGTG-3'				
Cbf $\alpha$ -1	上游引物	5'-GTATTGCTTTTTCCTGTTTGG-3'		60	120	AF093950
	下游引物	5'-TGAGCTGCCAGAATCACTCACT-3'				

注: GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;ALP:碱性磷酸酶;OPN:骨桥蛋白; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;Cbf $\alpha$ -1:核心结合因子  $\alpha$ -1

即平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白丝(图 1, 封三)。

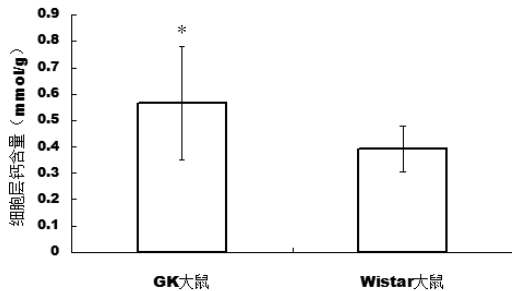
2.2 Wistar 大鼠和 GK 大鼠 SMCs 生长曲线 连续观察并计数细胞 7 d 后, 绘制生长曲线, 如图 2 所见, Wistar 大鼠 SMCs 生长速度明显快于 GK 大鼠 SMCs 的生长速度, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注: 与对照组 Wistar 大鼠相比, GK 大鼠 SMCs 生长速度明显缓慢(经重复测量资料的方差分析结果显示  $F=363.392$ ,  $P < 0.05$ )

图 2 Wistar 大鼠和 GK 大鼠 SMCs 生长曲线

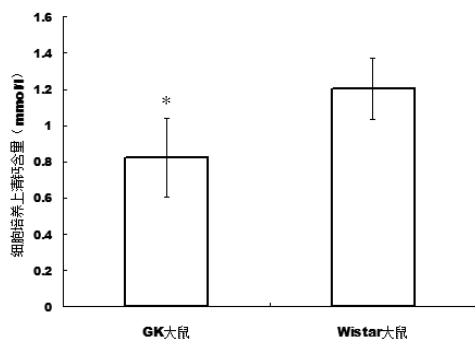
2.3 Wistar 大鼠和 GK 大鼠 SMCs 细胞层钙含量 与 Wistar 大鼠 SMCs 相比, GK 大鼠 SMCs 细胞层钙含量明显增加[( $0.56 \pm 0.22$ ) vs. ( $0.39 \pm 0.09$ ) mmol/g,  $t=2.47$ ,  $P < 0.05$ ], 见图 3。



注: 与对照组 Wistar 大鼠相比,  $*P < 0.05$

图 3 GK 大鼠与 Wistar 大鼠 SMCs 细胞层钙含量

2.4 Wistar 大鼠和 GK 大鼠 SMCs 细胞上清中的钙含量 与 Wistar 大鼠 SMCs 相比, GK 大鼠 SMCs 细胞上清液钙含量明显减少[( $0.82 \pm 0.22$ ) vs. ( $1.20 \pm 0.17$ ) mmol/L,  $t=-22.573$ ,  $P < 0.05$ ], 见图 4。



注: 与对照组 Wistar 大鼠相比,  $*P < 0.05$

图 4 GK 大鼠与 Wistar 大鼠 SMCs 细胞培养上清液钙含量

2.5 GK 大鼠和 Wistar 大鼠 SMCs 中 ALP、OPN、Cbfa-1、 $\alpha$ -SMA mRNA 的表达 与 Wistar 大鼠 SMCs 相比, GK 大鼠 SMCs 中 ALP、Cbfa-1 及 OPN mRNA 表达增加, 而  $\alpha$ -SMA 表达降低( $P$  均  $< 0.05$ ), 见表 2。

表 2 GK 大鼠和 Wistar 大鼠 SMCs 中 ALP、OPN、Cbfa-1、 $\alpha$ -SMA mRNA 的表达

分组	Wistar 大鼠	GK 大鼠	t 值
ALP mRNA	1	$1.40 \pm 0.0817^*$	12.963
Cbfa-1 mRNA	1	$1.67 \pm 0.1956^*$	10.109
OPN mRNA	1	$2.35 \pm 0.2986^*$	8.305
$\alpha$ -SMA mRNA	1	$0.70 \pm 0.0951^*$	8.219

注: 与对照组 Wistar 大鼠比较,  $*P < 0.05$ 。ALP: 碱性磷酸酶; Cbfa-1: 核心结合因子  $\alpha$ -1; OPN: 骨桥蛋白;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

### 3 讨论

GK 大鼠为一种自发性 2 型糖尿病动物模型, 国内研究显示, 该模型大鼠表现为轻、中度高血糖, HbA1c 水平升高, 胰岛素抵抗, 血脂升高, 胰岛素分泌能力减退, 温和的糖尿病心肌病变。其具有 2 型糖尿病特点, 为良好的 2 型糖尿病动物模型<sup>[9-10]</sup>。因 GK 大鼠是通过筛选糖耐量处于上限的 Wistar 大鼠近交繁殖并重复数代而得, 故在研究 GK 大鼠时, 多采用 Wistar 大鼠作为对照组。

本研究发现, 与 Wistar 大鼠 SMCs 相比, GK 大鼠 SMCs 生长速度明显减慢。有研究显示体外培养的细胞发生钙化时, 细胞增殖能力下降<sup>[11]</sup>。细胞衰老与血管钙化密切相关<sup>[12]</sup>。亦有研究显示, 糖尿病血管钙化与细胞凋亡密切相关<sup>[13-15]</sup>。本研究中观察到的 GK 大鼠 SMCs 生长速度减慢可能与细胞凋亡增加相关。GK 大鼠 SMCs 细胞层钙含量明显增加, 培养上清液中钙含量明显减少。Wada 等<sup>[16]</sup>研究也显示, 体外培养的钙化血管平滑肌细胞的细胞层钙含量增加, 同时培养上清液中钙含量明显减少。另外, 本研究进一步发现, ALP、OPN、Cbfa-1 的基因表达增加,  $\alpha$ -SMA 的基因表达减少。已有研究证实, 在血管钙化过程中平滑肌细胞可发生表型转变, 由表达  $\alpha$ -SMA 的收缩型向表达 ALP、OPN、Cbfa-1 的成骨型转化, 由此启动细胞钙化程序。本研究中离体培养的高糖、高脂喂养的 16 周龄 GK 大鼠 SMCs 已显示出上述成骨型细胞的部分特性, 并出现细胞层钙盐沉积。由此推测, GK 糖尿病大鼠在高糖、高脂的环境下, 血管 SMCs 会向成骨型细胞转化, 易发生钙沉积。在血管未形成钙化斑块前(进行原代 SMCs 培养时肉眼所见), 已出现 SMCs 的成骨样改变。综合上述结果, 本研究中获取

的细胞可能作为糖尿病相关血管钙化早期的模型。既往研究糖尿病相关钙化的细胞模型则是集中于应用  $\beta$ -甘油磷酸和晚期糖基化终末产物共同干预 SMCs, 导致细胞更严重的钙化<sup>[17-18]</sup>。

糖尿病与血管钙化的发生密切相关。已有研究显示, 糖尿病时高血糖、高胰岛素血症及其相关因子、氧化应激、脂代谢紊乱、炎症反应、细胞凋亡、骨调节蛋白表达异常、肥胖、脂肪因子、糖尿病肾病可影响血管钙化发生、发展。推测早期干预可能延缓糖尿病相关血管钙化, 但是何时干预更为有效需要进一步的探索研究。对糖尿病动物及细胞模型的血管钙化相关指标的研究有助于寻找防治糖尿病相关血管钙化的时间靶点。综上, 本研究结果显示体外培养高糖、高脂喂养 GK 大鼠可获得钙化主动脉 SMCs, 其可能作为研究糖尿病相关血管钙化的细胞模型。糖尿病相关血管钙化的具体机制尚有待更深入的研究证实。

### 参 考 文 献

- [1] Wayhs R, Zelinger A, Raggi P. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(2): 225-230.
- [2] Arad Y, Spadaro LA, Goodman K, et al. Prediction of coronary events with electron beam computed tomography[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(4): 1253-1260.
- [3] Keelan PC, Bielak LF, Ashai K, et al. Long-term prognostic value of coronary calcification detected by electron-beam computed tomography in patients undergoing coronary angiography [J]. *Circulation*, 2001, 104(4): 412-417.
- [4] Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, et al. Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study[J]. *Diabetes*, 2003, 52(11): 2833-2839.
- [5] Colhoun HM, Rubens MB, Underwood SR, et al. The effect of type 1 diabetes mellitus on the gender difference in coronary artery calcification[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(7): 2160-2167.
- [6] Arad Y, Newstein D, Cadet F, et al. Association of multiple risk factors and insulin resistance with increased prevalence of asymptomatic coronary artery disease by an electron-beam computed tomographic study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): 2051-2058.
- [7] Matsumoto K, Sera Y, Abe Y, et al. Inflammation and insulin resistance are independently related to all-cause of death and cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 169(2): 317-321.
- [8] Mehta NN, Krishnamoorthy P, Martin SS, et al. Usefulness of insulin resistance estimation and the metabolic syndrome in predicting coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Cardiol*, 2011, 107(3): 406-411.
- [9] 顾迁, 高鑫, 徐平, 等. GK 糖尿病大鼠生物学特性观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(12): 688-692.
- [10] 徐倍, 吴国亭, 韩玉麒, 等. 2 型糖尿病 GK 大鼠病程进展与组织形态学改变[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2007, 28(5): 17-21, 25.
- [11] 张超, 龚跃昆, 刘劲松, 等. 兔脂肪基质细胞的分离培养及其成骨活性的研究[J]. *昆明医学院学报*, 2009, 30(7): 33-36.
- [12] Iijima K. Bone and calcium update; diagnosis and therapy of bone metabolism disease update. Regulatory Mechanism of Mammalian Sirtuin SIRT1 in Vascular calcification: impact of vascular smooth muscle cell senescence[J]. *Clin Calcium*, 2011, 21(12): 53-60.
- [13] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies[J]. *J Circ Res*, 2000, 87(11): 1055-1062.
- [14] Lee KM, Kang HA, Park M, et al. Interleukin-24 attenuates beta-glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(1): 50-55.
- [15] Ponnusamy A, Sinha S, Hyde GD, et al. 3 FTI-277 inhibits vascular calcification by activating downstream PI3K/Akt signalling and preventing apoptosis of vascular smooth muscle cell[J]. *Heart*, 2011, 97(20): e7.
- [16] Wada T, McKee MD, Steitz S, et al. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin[J]. *Circ Res*, 1999, 84(2): 166-178.
- [17] Ren X, Shao H, Wei Q, et al. Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(3): 847-854.
- [18] Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, et al. Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK[J]. *J Vasc Res*, 2009, 46(6): 572-580.

(收稿日期: 2013-11-01)