

CTGF 通过调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路 在血管钙化中的作用

吴伟,程龙,王杰,杨传蕾,尚玉强

摘要 **目的** 探究结缔组织生长因子(CTGF)在主动脉血管钙化过程中的作用和机制。**方法** 体外培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7r5)进行血管钙化模型构建,通过茜素红染色结果确定最佳钙化时间。细胞转染 CTGF-siRNA 质粒,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 CTGF 的表达量。为确定 CTGF 对细胞钙化的作用,将细胞随机分为 7 组。采用茜素红染色观察 CTGF 对 A7r5 细胞钙化的影响,采用 ELISA 法检测 A7r5 细胞中碱性磷酸酶(ALP)的活性变化,采用 RT-PCR 测定 A7r5 细胞中 OPG、RANK 和 RANKL 的表达情况。**结果** A7r5 的最佳钙化时间为 48 h。与对照组相比,CTGF-siRNA 组细胞中 CTGF 的表达量降低,说明细胞成功转染 CTGF-siRNA 质粒。与模型组比较,CTGF-siRNA 组 A7r5 细胞中的钙化结节表达量减少,ALP 的活性降低($P < 0.05$),OPG、RANK 和 RANKL 的表达也下调($P < 0.05$)。**结论** 沉默 CTGF 能够减少高磷高钙所诱导的 A7r5 细胞钙化和降低 ALP 的活性,调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路,从而在主动脉血管钙化中的发挥作用。

关键词 CTGF;血管钙化;OPG/RANK/RANKL 信号通路

中图分类号 R 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1257-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.015

血管钙化(vascular calcification, VC)是动脉粥样硬化、慢性肾病、糖尿病、高血压、绝经后综合征、动脉狭窄和老年患者的常见病理表现^[1]。VC 的病理异常是导致心血管发病率和病死率高的重要因素之一^[2-3]。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)为肿瘤坏死因子受体超家族的成员之一,主要作用是抑制破骨细胞形成,促进破骨细胞凋亡,细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)能够与破骨细胞表面的 RANK 结合,促进破骨细胞前体分化和活化形成成熟的破骨细胞^[4-5]。大量的研究表明 VC 主要表现

为血管平滑肌(vascular smooth muscle cell, VSMC)发生向成骨细胞的表型转化过程,目前的研究^[6-7]认为 OPG/RANKL/RANK 在血管壁平滑肌细胞收缩表型向成骨表型转化中发挥了重要作用。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种由 349 个氨基酸组成,分子量为 34~38 ku 的富含半胱氨酸的分泌肽。有研究^[8]表明,CTGF 可促进成骨细胞 OPG 分泌,并抑制 RANKL 的表达,提示 CTGF 可能间接抑制成熟破骨细胞活化的作用。但是 CTGF 是否在血管钙化过程中能够通过调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路来影响疾病发生的进展需要进一步的研究。因此,该研究通过沉默细胞中 CTGF 基因,构建体外血管钙化模型,验证血管钙化过程中 CTGF 对 OPG/RANK/RANKL 信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 大鼠胸主动脉平滑肌 A7r5 来源于中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自天津 TBD 公司;Opti-MEM 和 DMEM 购自美国 Gibco 公司;CaCl₂ 和 10 mmol/L β -甘油磷酸盐购自美国 sigma 公司;Lipofectamine™ RNAiMAX 购自美国 Invitrogen 公司;茜素红法钙质染色试剂盒购自上海歌凡生物技术有限公司;Boldine 和 AR234960 购自美国 MCE 公司;碱性磷酸酶测定试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Ambion 公司。SYBR FAST qPCR Master Mix 购自美国 KAPA Biosystems 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京 solarbio 公司;LBS#111112100 CO₂ 恒温培养箱购自美国 LabServ™ 公司;BM-38XD 倒置荧光显微镜购自上海析域仪器设备有限公司;CFX-Connect 96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;AMR-100 酶标仪购自杭州奥盛仪器有限公司;Tanon-5200 全自动化学发光分析仪购自上海天能科技有限公司。

1.2 细胞培养 将冻存的 A7r5 细胞从液氮罐中取出,在 37 °C 水浴中完全融化后,将细胞悬液吸至离心管中,加入 4 ml 完全培养基(90% DMEM + 10%

2022-05-10 接收

基金项目:湖北省卫生健康委员会联合基金(编号:WJ2019H374)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院心脏大血管外科,武汉 430000

作者简介:吴伟,男,副主任医师;

尚玉强,男,主任医师,责任作者,E-mail: wuweil9830223

FBS), 1 337 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 细胞重新悬浮于 1 ml 培养基中, 转移至培养瓶中, 加入 4 ml 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养。

1.3 细胞转染检测 转染前 24 h, 将 5×10^5 个细胞重悬于 1.5 ml 完全培养基中。分别取 100 pmol siRNA 和 5 μ l Lipofectamine[®] RNAiMAX 稀释于 250 μ l Opti-MEM 中, 轻轻吹吸 5 次混匀, 室温下静置 5 min。两种稀释液混匀后室温孵育 20 min。将 500 μ l 混合物加到含有细胞和 1.5 ml 新鲜完全培养基的培养板中, 最后将细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 转染 4 h 后换新鲜完全培养基培养 24 h。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测转入基因 CTGF 的表达情况。

1.4 细胞钙化模型构建及分组 收集 A7r5 细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10^5 个/ml, 将 1 ml 细胞悬液加入 12 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。钙化培养基 [DMEM + 10 mmol/L β -甘油磷酸盐(BGP) + 3 mmol/L CaCl₂] 诱导 A7r5 细胞钙化, 诱导 0、12、24、48、72 h。取出细胞培养板进行后续检测。为了验证 CTGF 在主动脉血管钙化中的作用, 将实验分为 7 组。对照组: 不进行任何处理; 模型组: A7r5 细胞诱导钙化; AR234960 激动剂组: A7r5 细胞诱导钙化后, AR234960 激动剂 (10 μ mol/L, 12 h) 处理; CTGF-siRNA 组: A7r5 细胞诱导钙化后, CTGF-siRNA 转染处理; siRNA-NC 组: A7r5 细胞诱导钙化后, siRNA-NC 转染处理; Boldine 抑制剂组: A7r5 细胞诱导钙化后, Boldine 抑制剂 (80 μ mol/L, 12 h) 处理; Boldine + AR234960 组: VSMC 细胞诱导钙化后, 先进行 Boldine (80 μ mol/L, 12 h) 抑制剂处理, 再进行 AR234960 激动剂 (10 μ mol/L, 12 h) 处理。

1.5 茜素红染色 将 12 孔板中的 A7r5 细胞干预后弃去上清液, 各组细胞用 PBS 洗 3 次。用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后吸去 4% 多聚甲醛溶液。加入 2 ml 茜素红染液, 室温染色 30 min, 蒸馏水速洗。在倒置荧光显微镜下观察染色效果并拍照。

1.6 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 活性检测 将 12 孔板中的 A7r5 细胞干预后弃去上清液, 设定空白管、标准管和测定管。空白管加入 0.03 ml 双蒸水, 测定管中加入 0.03 ml 样本, 标准管加入 0.03 ml 标准液; 每管加入 0.5 ml 缓冲液和 0.5 ml 基质液, 充分混匀, 37 °C 水浴 15 min 后加入 1.5 ml 显色液; 在 520 nm 的波长下测各管吸光度。

1.7 荧光定量 qRT-PCR 取 1 ml 的 TRIzol 加入

细胞培养板中提取总 RNA, 然后将 RNA 逆转录为 cDNA, 最后将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 反应程序为: 预变性 95 °C、3 min; 95 °C、5 s, 56 °C、10 s, 72 °C、25 s (40 cycles), 记录数据, 实验重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对含量。PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列	扩增片段大小(bp)
CTGF-F	TTCCCGAGAAGGGTCAAG	143
CTGF-R	GCTCGCATCATAGTTGGGT	
OPN-F	ACAGTATCCCGATGCCACA	136
OPN-R	GCTGGTCTTCCCGTTGC	
RANK-F	TCACAGCCTCCGAATGG	242
RANK-R	CAGGCTAGGCAACTGTCATC	
RANKL-F	TCGGGTTCCTCCATAAAGTC	138
RANKL-R	GAAGCAAATGTTGGCCTA	
GAPDH-F	CAAGTCAACGGCACAG	138
GAPDH-R	CCAGTAGACTCCACGACAT	

1.8 Western blot 提取各组细胞的蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白质的含量。20 μ g 蛋白加入凝胶中 (配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶), 浓缩胶恒压 80 V 40 min, 分离胶恒压 120 V 50 min。恒压 90 V 转膜 50 min, 5% 脱脂奶粉室温封闭 4 °C 过夜, 加入一抗 (CTGF 1 : 500; GAPDH 1 : 1 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后二抗 (Goat anti-Rabbit IgG 1 : 10 000) 室温孵育 1 h。加入 ECL 发光液后置于全自动化学发光分析仪中显色。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计学软件进行统计学处理, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞钙化模型构建 茜素红染色结果显示如图 1, 钙化模型诱导 12 h 后能够看到少量橘红色的钙化结节 (图中细胞外的红色可能是由于细胞钙化时添加的 CaCl₂ 未清洗干净造成的), 钙化模型诱导时间为 48 h 时, 钙化结节增多, 而诱导时间为 72 h 时, 钙化诱导过度, 产生的钙化结节过多。因此钙化模型诱导的最佳时间为 48 h。

2.2 转染后细胞中 CTGF 表达水平检测结果 转染 CTGF-siRNA 表达质粒后, 与对照组比较, 阴性对照组 A7r5 细胞中 CTGF 相对表达量差异无统计学

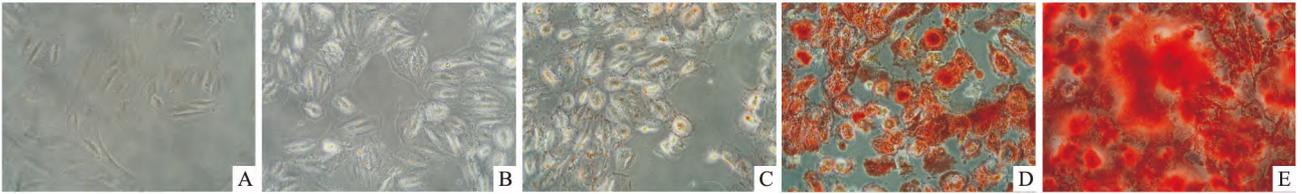


图1 A7r5 细胞的钙化表达情况 茜素红 ×200
A:0 h;B:12 h;C:24 h;D:48 h;E:72 h

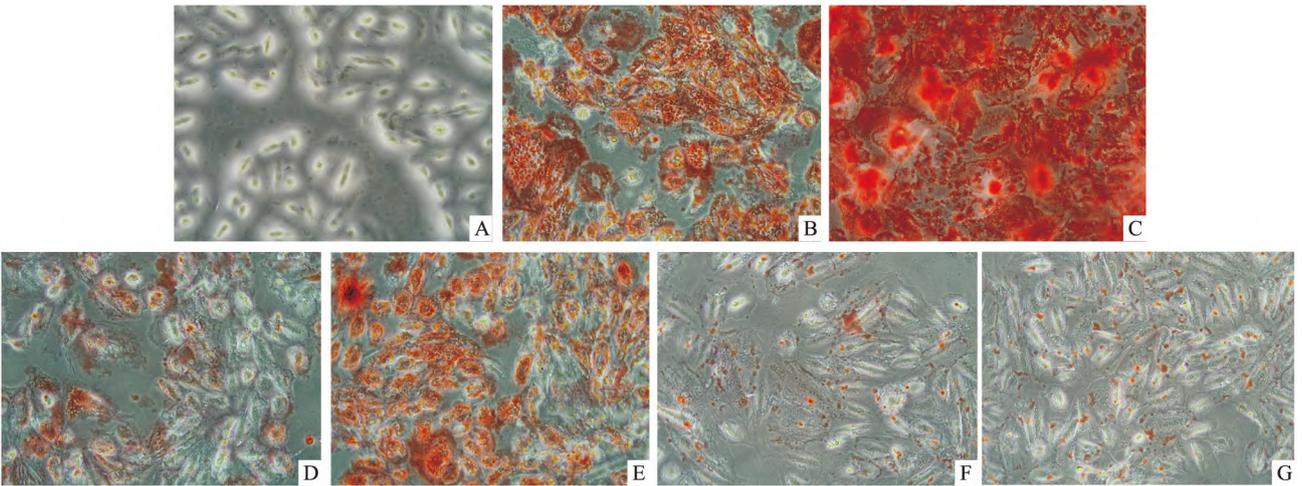


图2 CTGF-siRNA 对细胞钙化的影响 茜素红 ×200
A:对照组;B:模型组;C:AR234960 激动剂组;D:CTGF-siRNA 组;E:siRNA-NC 组;F:Boldine 抑制组;G:AR234960 + Boldine 组

意义, CTGF-siRNA-1、CTGF-siRNA-2 和 CTGF-siRNA-3 组 A7r5 细胞中 CTGF 相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果如表 2。结果表明转染 siRNA 表达质粒后能有效降低 CTGF 的表达量。

表2 CTGF-siRNA 和 Western blot 检测转染后细胞中 CTGF 的表达水平 ($n = 3$)

组别	CTGF (mRNA)	CTGF
对照	1	0.85 ± 0.005
CTGF + siRNA-1	0.16 ± 0.01 *	0.48 ± 0.02
CTGF + siRNA-2	0.59 ± 0.05 *	0.66 ± 0.007 *
CTGF + siRNA-3	0.58 ± 0.02 *	0.66 ± 0.02 *
阴性对照	0.95 ± 0.05	0.84 ± 0.01 *
F 值	272.9	440.4

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 CTGF-siRNA 对细胞钙化的影响 由图 2 可知, 与模型组相比, siRNA-NC 组钙化结节的量基本没有变化, CTGF-siRNA、AR234960 + Boldine 和 Boldine 抑制组的钙化结节减少, AR234960 激动剂组的钙化结节增多。

2.4 CTGF-siRNA 对细胞的 ALP 活性影响 ALP 活性测定结果显示如图 3 ($F = 204.3$), 与模型组相比, siRNA-NC 组 ALP 的活性基本没有变化, CTGF-

siRNA 组, AR234960 + Boldine 组和 Boldine 抑制组的 ALP 的活性降低 ($P < 0.05$), AR234960 激动剂组的 ALP 的活性升高 ($P < 0.05$)。

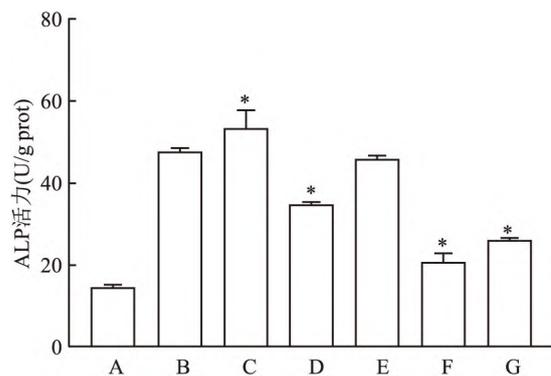


图3 A7r5 细胞中的 ALP 活性

A:对照组;B:模型组;C:AR234960 激动剂组;D:CTGF-siRNA 组;E:SiRNA-NC 组;F:Boldine 抑制剂组;G:AR234960 + Boldine 组;与对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 CTGF-siRNA 对细胞中 OPG、RANK、RANKL 表达的影响 由表 3 可知, 与模型组相比, siRNA-NC 组 OPG、RANK、RANKL 的表达量基本没有变化, CTGF-siRNA、AR234960 + Boldine 和 Boldine 抑制组的 CTGF、RANK、RANKL 的表达量降低 ($P <$

表3 A7r5 细胞中 CTGF、OPG、RANK 和 RANKL 的表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	CTGF	OPG	RANK	RANKL
对照	1	1	1	1
模型	8.67 ± 0.63	0.38 ± 0.02	14.07 ± 0.75	11.21 ± 0.89
AR234960 激动剂	22.32 ± 0.71 *	0.22 ± 0.01 *	40.35 ± 4.01 *	21.84 ± 1.47 *
CTGF-siRNA	4.84 ± 0.16 *	0.75 ± 0.02 *	7.86 ± 0.47 *	6.61 ± 0.61 *
siRNA-NC	8.31 ± 1.23	0.37 ± 0.05	15.89 ± 1.81	9.87 ± 1.17
Boldine 抑制剂	2.02 ± 0.29 *	2.83 ± 0.16 *	1.88 ± 0.21 *	3.68 ± 0.33 *
AR234960 + Boldine	3.68 ± 0.53 *	1.87 ± 0.11 *	3.94 ± 0.52 *	5.45 ± 1.06 *
F 值	391.7	483.9	193.1	164.9

与对照组比较: * $P < 0.05$

0.05), OPG 表达量升高 ($P < 0.05$)。AR234960 激动剂组 CTGF、RANK、RANKL 的表达量升高 ($P < 0.05$), OPG 表达量降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

VC 是指在血管中以磷酸钙复合物的形式沉积的矿物,近年来的研究^[9-10]表明,VC 与动脉粥样硬化、高血压、糖尿病肾病、心肌梗死等多种疾病密切相关,是心血管疾病高发病率和病死率的重要原因。随着我国人口老龄化趋势的加重和人们生活水平的提高,血管钙化的发生率也在逐渐提高,与其相关的许多心血管疾病已严重危害到人类的健康。血管钙化是一种与骨发育类似的主动的、可预防和可逆转的高度可调控的生物学过程,因此,研究血管钙化的发生、发展及其发病机制,为血管钙化的有效防治具有重要临床意义。本研究按照已报道的钙化模型^[11],即采用 10 mmol/L β -甘油磷酸盐 (BGP) 和 3 mmol/L CaCl_2 诱导 A7r5 细胞钙化,证明了沉默 CTGF 能够减少 A7r5 细胞的钙化。

ALP 是一种在碱性条件下能够分解磷酸二甲苯生成游离的酚和磷酸,广泛分布于人体骨骼、肠、肾和胎盘等组织。它能够通过调节矿化抑制剂 PPI 的水平来促进血管钙化,目前已被证明是血管钙化病理生理焦磷酸途径中的一个具有促进作用的因子^[12]。有研究^[13]表明,血清中 ALP 水平与冠状动脉钙化和斑块易损性具有相关性。并且有研究^[14]表明 ALP 是血清中胶原蛋白钙化所必需的因子。因此,降低 ALP 的活性能够有效预防血管钙化的发生,本实验显示 CTGF-siRNA 能够有效降低 ALP 的活性。

OPG/RANK/RANKL 信号通路在调控成骨细胞形成及骨重建中发挥重要作用。OPG 通过与 RANKL 结合,阻断 RANK 与其结合,从而抑制骨吸收,维持骨代谢平衡^[15]。课题组在实验中使用腺病

毒转染 A7r5 使 CTGF 基因沉默,显示 RANK、RANKL 基因水平降低,OPG 基因水平上升,说明沉默 CTGF 基因能够通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路从而减轻细胞钙化程度。同时, Liu et al^[16]研究发现,补肾活血汤能够通过调节 OPG/RANK/RANKL 抑制血管平滑肌的成骨分化,有效防止 VSMCs 从收缩型到成骨表型的表型转换过程,进而影响细胞钙化的形成。为了进一步明确上述猜测,本研究使用 OPG/RANK/RANKL 信号通路的激动剂 (AR234960) 和抑制剂 (Boldine) 干预,测定 OPG/RANK/RANKL 信号通路对细胞钙化的影响。本实验结果显示,加入 AR234960 后,RANK 和 RANKL 基因水平上升,OPG 基因水平下降,细胞钙化结节增多。但加入 Boldine 后,RANK 和 RANKL 基因水平下降,OPG 基因水平上升,细胞钙化结节减少,这说明沉默 CTGF 基因与 Boldine 有相同的作用,进一步证明了 CTGF 基因是通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路从而达到抑制细胞钙化的目的。

综上所述,本研究成功建立了 A7r5 细胞的钙化模型,通过实验确定沉默 CTGF 基因能够减轻血管平滑肌的钙化程度,降低 ALP 活性,调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路,从而抑制主动脉血管钙化的进展,为血管钙化的治疗提供了新的靶点。

参考文献

- [1] Yahagi K, Kolodgie F D, Lutter C, et al. Pathology of human coronary and carotid artery atherosclerosis and vascular calcification in diabetes mellitus[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37 (2): 191-204.
- [2] Durham A L, Speer M Y, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4): 590-600.
- [3] Lee S J, Lee I K, Jeon J H. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2685.
- [4] 沈丽英, 李涯松, 张莹莹, 等. 益肾蠲痹法含药血清对大鼠成

- 骨和破骨细胞 opg/rankl/rank 信号通路的响[J]. 中华全科医学, 2020, 18(2): 38-42.
- [5] 陈婧, 王春艳, 苏培培, 等. Rank/rankl/opg 系统在慢性肾脏病血管钙化中的作用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2020, 20(76): 42-4.
- [6] Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 19-26.
- [7] Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 2-11.
- [8] Kim B, Kim H, Jung S, et al. A CTGF-RUNX2-RANKL axis in breast and prostate cancer cells promotes tumor progression in bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(1): 155-66.
- [9] 于思明, 张显龙. 中医药防治血管钙化的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(18): 2260-3.
- [10] Lankinen R, Hakamäki M, Metsärinne K, et al. Association of maximal stress ergometry performance with troponin T and abdominal aortic calcification score in advanced chronic kidney disease[J]. *BMC Nephrol*, 2021, 22(1): 50.
- [11] Kong Y, Liang Q, Chen Y, et al. Hyaluronan negatively regulates vascular calcification involving BMP2 signaling[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(10): 1320-32.
- [12] Andleeb H, Hussain M, Abida Ejaz S, et al. Synthesis and computational studies of highly selective inhibitors of human recombinant tissue non-specific alkaline phosphatase (h-TNAP): A therapeutic target against vascular calcification[J]. *Bioorg Chem*, 2020, 101: 103999.
- [13] Ren Y, Li X, Wang S, et al. Serum alkaline phosphatase levels are associated with coronary artery calcification patterns and plaque vulnerability[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2021, 97 Suppl 2: 1055-62.
- [14] Price P A, Toroian D, Chan W S. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum: a possible mechanism for biomineralization[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(7): 4594-604.
- [15] 李小娜. OPG/RANK/RANKL 信号通路研究进展[J]. 河南医学研究, 2018, 27(10): 1802-4.
- [16] Liu S Y, Meng X F, Liu S W, et al. Effect of Bushen Huoxue decoction on inhibiting osteogenic differentiation of vascular smooth cells by regulating OPG/RANK/RANKL system in vascular calcification[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(6): 125.

Effect of CTGF in vascular calcification by regulation of aortic OPG/RANK/RANKL signaling pathway

Wu Wei, Cheng Long, Wang Jie, Yang Chuanlei, Shang Yuqiang

(Dept of Cardiac and Macrovascular Surgery, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000)

Abstract Objective To explore the effect of connective tissue growth factor (CTGF) on aortic calcification and its mechanism. **Methods** *In vitro* rat vascular smooth muscle cells (A7r5) were used for vascular calcification model construction, and the time of calcification was determined using Alizarin staining. The cells were randomly divided into 7 groups to determine the effect of CTGF on calcification. Cells were transfected with CTGF-siRNA plasmid, and the expression of CTGF in cells was detected by RT-PCR and Western blot. To determine the effect of CTGF on cell calcification, cells were randomly divided into 7 groups. Alizarin staining was used to analyze the effect of CTGF on calcification. ELISA was used to detect the alkaline phosphatase (ALP) activity. RT-PCR was used to determine the expression of OPG, RANK and RANKL in A7r5 cells. **Results** The optimal time for calcification of A7r5 was 48 h. The expression of CTGF was reduced in the cells of the CTGF-siRNA group compared to the Control group, indicating that A7r5 were successfully transfected with the CTGF-siRNA. Compared with the model group, the expression of calcified nodules was reduced, the activity of alkaline phosphatase significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of OPG, RANK and RANKL was also significantly downregulated in the CTGF-siRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** CTGF-siRNA attenuated A7r5 cell calcification and alkaline phosphatase activity induced by high phosphorus and calcium, and regulated the OPN/RANK/RANKL signaling pathway, so as to play a therapeutic role in aortic vascular calcification.

Key words CTGF-siRNA; vascular calcification; OPG/RANK/RANKL signaling pathway