

外源 GDF11 对人主动脉内皮细胞钙化的影响

盛 瑛¹ 张宸铭¹ 陈 亮² 徐佰达² 靳天慧¹ 刘叶红¹ 叶 挺² 宗刚军^{1,2}

摘要 目的 建立体外人主动脉内皮细胞(HAEC)钙化模型,探讨外源生长分化因子11(GDF11)对钙化的影响。方法 使用低浓度(10 mmol/L)/高浓度(30 mmol/L)β-甘油磷酸+100 nmol/L地塞米松+50 μg/ml L-抗坏血酸刺激HAEC,筛选出有效钙化诱导方案;使用不同浓度GDF11(0、30、50、100 ng/ml)刺激HAEC不同时间(0、8、24、48 h)筛选出GDF11有效作用浓度与时间;将HAEC分为空白组、GDF11组、钙化组、GDF11+钙化组。采用Western blot检测骨形态发生蛋白(BMP)2、BMP4、GDF11的表达;细胞免疫荧光检测GDF11的表达;RT-PCR检测成骨细胞特异转录因子(Runx2)、Runx2下游基因Osterix及GDF11的基因表达;茜素红S染色检测钙化沉积。结果 ①高浓度组的GDF11、BMP4、BMP2蛋白表达水平均高于空白对照组($P < 0.05$);高浓度组的Runx2、Osterix、GDF11基因表达水平均高于空白对照组($P < 0.05$);茜素红染色显示,高浓度组钙盐沉积较空白对照组增加;②100 ng/ml GDF11预处理24 h后,BMP2、BMP4蛋白表达较钙化组下降($P < 0.05$);③与钙化组比较,GDF11+钙化组BMP2、BMP4蛋白表达下降($P < 0.05$),GDF11组与空白组比较差异无统计学意义;与钙化组比较,GDF11+钙化组的钙化沉积减少,GDF11组与空白组比较差异无统计学意义;GDF11+钙化组Runx2、Osterix基因水平均低于钙化组($P < 0.05$),但GDF11组与空白组比较差异无统计学意义。结论 外源GDF11可抑制HAEC钙化,可能与抑制HAEC成骨分化有关。

关键词 生长分化因子11;血管钙化;人主动脉内皮细胞
中图分类号 R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1689-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.009

血管钙化是糖尿病、动脉粥样硬化等疾病在血管方面的特征性病理改变。一旦血管钙化发生,将

导致血压波动、斑块破裂、血栓形成等严重后果^[1-2]。研究^[3]表明,血管钙化与平滑肌细胞或内皮细胞的成骨转分化、炎症、凋亡或外泌体的释放均紧密相关。钙化发生时主要表现为成骨转录因子Runx2、Osterix及其下游成骨相关蛋白,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)2、BMP4、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等的表达增加^[4]。目前,有关转录生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)家族的BMP2、BMP4、BMP6促进血管钙化的研究较多,但尚未见同家族的生长分化因子11(growth differentiation factor 11, GDF11)在钙化方面的报道。有研究^[5-6]表明,补充外源性GDF11可逆转高龄小鼠因老化导致的心脏、骨骼肌、脑血管疾病。还有研究发现,GDF11可以促进破骨、抑制成骨分化过程^[7]。该研究拟用β-甘油磷酸、地塞米松、L-抗坏血酸诱导人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC)钙化,探究外源GDF11对钙化及其过程中成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 HAEC购自上海子实生物科技有限公司,以该细胞为研究对象,通过伦理委员会批准。内皮细胞基础培养基(endothelial cell medium, ECM)、内皮细胞生长因子(endothelial cell growth supplement, ECGs)、胎牛血清均购自美国ScienCell公司;胰蛋白酶、细胞裂解液购自北京碧云天公司;人源外源重组GDF11因子购自美国Peprotech公司;一抗BMP2、BMP4、GDF11均购自美国Abcam公司;内参蛋白β-actin购自美国ABSCI公司;二抗兔、FITC标记荧光二抗均购自杭州联科生物技术公司;HRP标记二抗鼠均购自美国CST公司;引物Runx2、Osterix、GAPDH、GDF11购自上海吉玛生物科技有限公司;基因检测荧光染料SYBR、逆转录酶购自南京Vazyme公司。

1.2 细胞培养 使用内皮细胞完全培养基(ECM+ECGs+5%胎牛血清),于5% CO₂的37℃恒温孵箱中培养,每2 d更换培养液,细胞长至培养表面70%~80%时,进行消化传代,取3~5代细胞进行

2020-03-20 接收

基金项目:江苏省青年医学重点人才基金项目(编号:QNRC2016883)

作者单位:¹安徽医科大学无锡临床学院心内科,无锡 214044

²中国人民解放军联勤保障部队第904医院心内科,无锡 214044

作者简介:盛 瑛,女,硕士研究生;

宗刚军,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zonggj@163.com

实验,以 1×10^5 /ml 的细胞数密度种植于六孔板。

1.3 方法

1.3.1 建立 HAEC 钙化模型 以 β -甘油磷酸为研究变量,进行分组实验,分为空白对照组、低浓度组、高浓度组。空白对照组常规培养 10 d;低浓度组予 10 mmol/L β -甘油磷酸 + 100 nmol/L 地塞米松 + 50 μ g/ml L-抗坏血酸培养 10 d;高浓度组予 30 mmol/L β -甘油磷酸 + 100 nmol/L 地塞米松 + 50 μ g/ml L-抗坏血酸培养 10 d。

1.3.2 实验分组 以 GDF11 为变量,探讨外源重组 GDF11 干预 HAEC 钙化的有效浓度及时间:① GDF11 预处理 48 h,按浓度梯度分为 5 组:空白组、钙化组、30 ng/ml 组(30 ng/ml GDF11)、50 ng/ml 组(50 ng/ml GDF11)、100 ng/ml 组(100 ng/ml GDF11);② 以 100 ng/ml GDF11 干预,按时间梯度分 5 组:空白组、钙化组、8 h 组、24 h 组、48 h 组;③ 筛选出 GDF11 有效干预浓度与时间后,HAEC 分 4 组进行后续实验:空白组(常规培养 12 d)、GDF11 组(予 100 ng/ml GDF11 预处理 48 h,再常规培养 10 d)、钙化组(常规培养 2 d 后,予钙化诱导 10 d)、GDF11 + 钙化组(予 100 ng/ml GDF11 预处理 48 h,再钙化诱导 10 d)。

1.3.3 Western blot 检测 BMP2(1 : 1 000)、BMP4(1 : 1 000)、GDF11(1 : 2 000)、内参蛋白 β -actin(1 : 3 000)。收集样本,提取总蛋白,于 80 V 恒压电泳 40 min 左右,待 marker 分开后,调至 120 V 恒压电泳至上样缓冲液脱落,350 mA 恒流转膜 80 min,5% BSA 封闭 1 h,孵育一抗(4 $^{\circ}$ C 过夜),TBST 洗膜 5 min 5 次,二抗(1 : 5 000)室温孵育 1 h,洗膜 5 min 5 次,滴加 ECL 曝光液进行显影,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与 β -actin 的比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.3.4 RT-PCR 检测 Runx2、Osterix、GDF11、GAPDH 基因表达水平。钙化诱导 10 d 后,收集细胞提取 RNA,测 RNA 浓度,按 Vazyme 逆转录和定量试剂盒说明书进行逆转录和定量检测。引物序列见表 1。

1.3.5 茜素红 S 染色 4% 多聚甲醛中室温固定细胞 30 min,用 PBS 洗 5 min 3 次,pH 4.2 的 2% 茜素红 S 浸染爬片 10 min,立即用 PBS 快速冲洗,直至洗液不变红,用封片剂封片,于镜下观察。

1.4 统计学处理 用 Graph Pad Prism 5.0 统计软件进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据的比较行方差齐性检验和单因素

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
Runx2	上游引物 GAACGAGGCAAGAGTTTCACC
	下游引物 TCTGGGTTCCCGAGGTCC
GDF11	上游引物 TCTTGGCGACTAAAACCCTAAC
	下游引物 GTGAGCGGATACGGATGTGAC
Osterix	上游引物 CCTCTGCGGGACTCAACAAC
	下游引物 AGCCCATTAGTGTCTTGTAAAGG
GAPDH	上游引物 CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
	下游引物 AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

方差分析,多组间的两两比较采用 SNK-q 检验,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HAEC 钙化模型的建立及钙化后内源 GDF11 表达的影响 Western blot 结果显示(图 1),高浓度组的 BMP2、BMP4、GDF11 蛋白相对表达水平均高于空白对照组($P < 0.05$);RT-PCR 结果显示(图 2),高浓度组 Runx2、Osterix、GDF11 的相对基因表达水平均高于空白对照组($P < 0.05$);茜素红 S 染色结果显示(图 3),高浓度组的钙化沉着高于空白对照组及低浓度组;细胞免疫荧光结果显示(图 4),高浓度组的 GDF11 荧光强度高于空白对照组及低浓度组。后续实验中钙化组即高浓度组的诱导

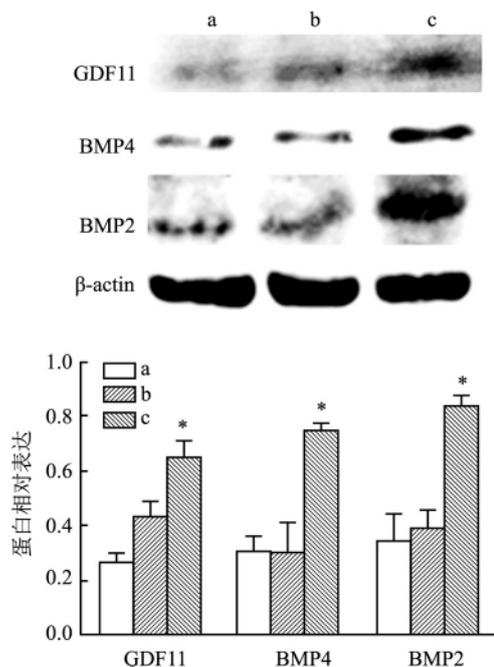


图 1 Western blot 检测各组 HAEC 内 GDF11、BMP4、BMP2 蛋白表达水平

a: 空白对照组; b: 低浓度组; c: 高浓度组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

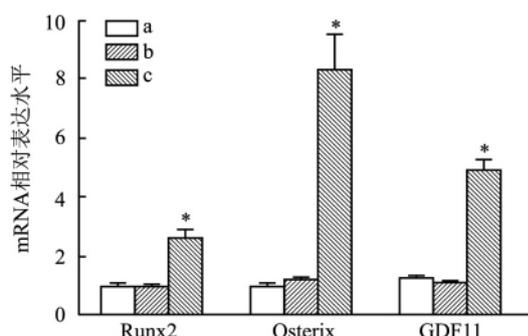


图2 RT-PCR检测各组HAEC内Runx2、Osterix、GDF11基因表达水平

a: 空白对照组; b: 低浓度组; c: 高浓度组; 与空白对照组比较:

* $P < 0.05$

方案。

2.2 外源GDF11对HAEC钙化有效作用浓度和时间 Western blot结果显示(图5),100 ng/ml组

BMP2、BMP4蛋白低于钙化组($P < 0.05$)。24 h组BMP2、BMP4蛋白低于钙化组($P < 0.05$)。24 h组与48 h组比较差异无统计学意义。后续GDF11+钙化组均以100 ng/ml GDF11预处理48 h作为GDF11有效干预浓度和时间。

2.3 外源GDF11对钙化相关蛋白及钙化沉积的影响 Western blot结果显示(图6),GDF11+钙化组BMP2、BMP4相对蛋白表达水平均低于钙化组($P < 0.05$)。但GDF11组BMP2、BMP4蛋白表达水平与空白组比较差异无统计学意义;茜素红S染色显示(图7),GDF11+钙化组钙化沉积较钙化组减少。

2.4 外源GDF11对钙化的HAEC核内成骨转录因子Runx2、Osterix的影响 RT-PCR结果显示(图8),与钙化组比较,GDF11+钙化组Runx2、Osterix基因表达水平均下降($P < 0.05$)。GDF11组Runx2、Osterix基因表达水平与空白组比较差异无

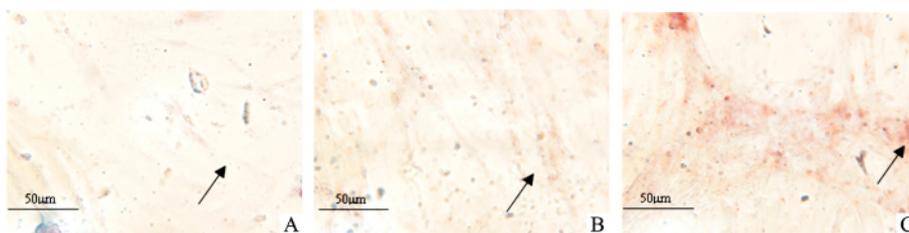


图3 各组HAEC钙化沉着的茜素红染色结果 ×400

A: 空白对照组; B: 低浓度组; C: 高浓度组; 箭头指示粉红色附着处为钙化沉积

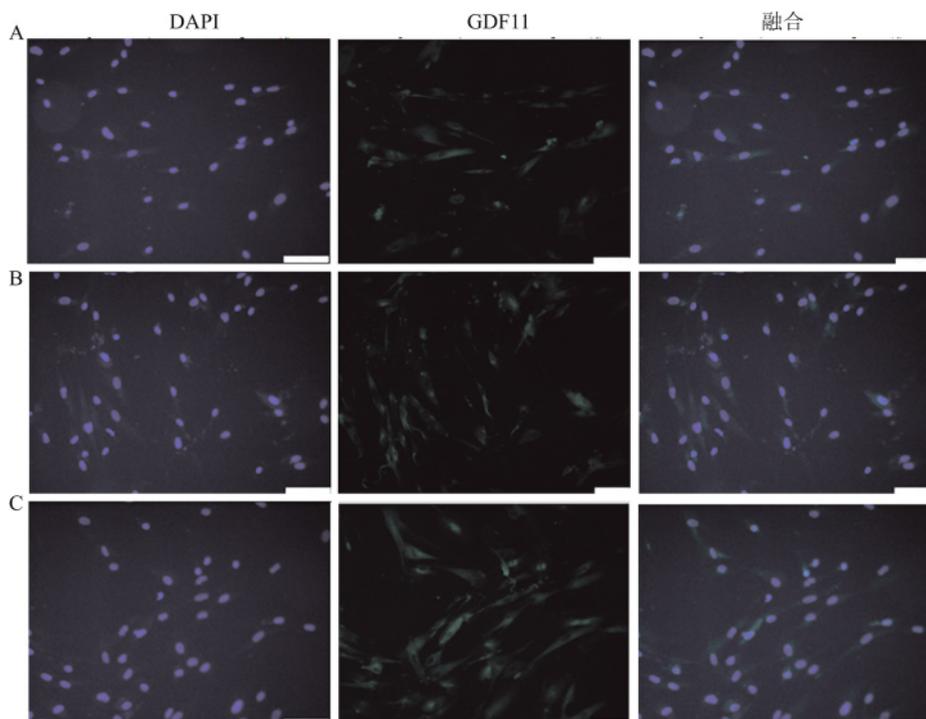


图4 各组HAEC细胞免疫荧光染色结果 ×200

A: 空白对照组; B: 低浓度组; C: 高浓度组; 绿色荧光表示目的蛋白GDF11,蓝色荧光表示细胞核

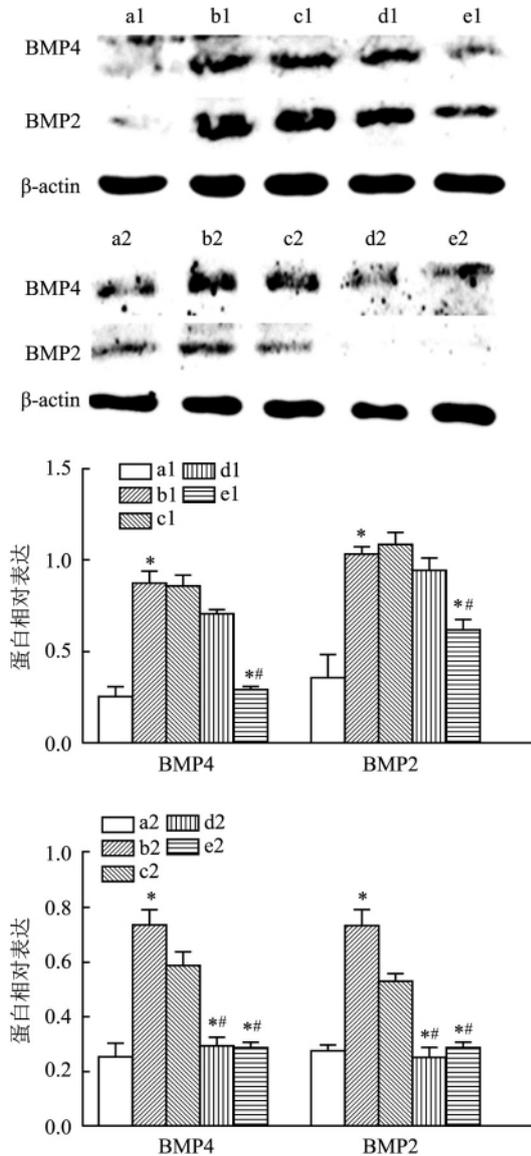


图5 Western blot 检测各组 HAEC 经不同浓度、时间外源 GDF11 预处理后 BMP2、BMP4 蛋白表达水平
a1: 空白组; b1: 钙化组; c1: 30 ng/ml GDF11 组; d1: 50 ng/ml GDF11 组; e1: 100 ng/ml GDF11 组; a2: 空白组; b2: 钙化组; c2: 8 h GDF11 组; d2: 24 h GDF11 组; e2: 48 h GDF11 组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与钙化组比较: # $P < 0.05$

统计学意义。

3 讨论

血管钙化是由内皮细胞、间质细胞、免疫细胞等相互作用 机械损伤、炎症、新陈代谢、信号转导等所支配的骨质矿化的复杂过程^[8]。血管内皮细胞作为血管的最内层结构,最易受血流冲击引起机械损伤及炎症反应。其次内皮细胞与血液直接接触,是多种分子的靶细胞,最易受到各种分子的作用。有研究^[9-10]指出主动脉瓣膜内皮细胞可分泌一氧化

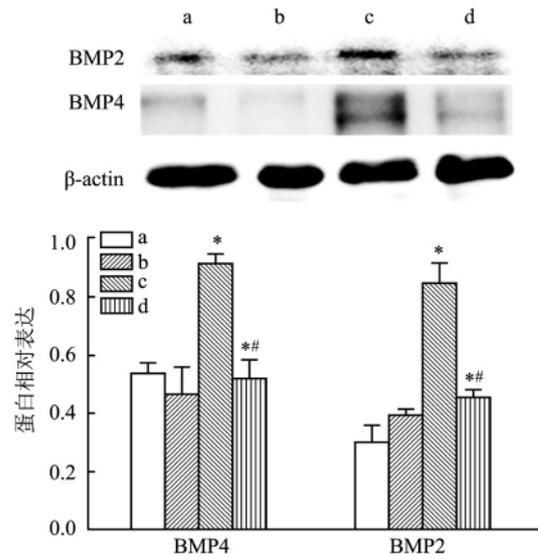


图6 Western blot 检测各组 HAEC 内 BMP2、BMP4 蛋白表达水平
a: 空白组; b: GDF11 组; c: 钙化组; d: GDF11 + 钙化组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与钙化组比较: # $P < 0.05$

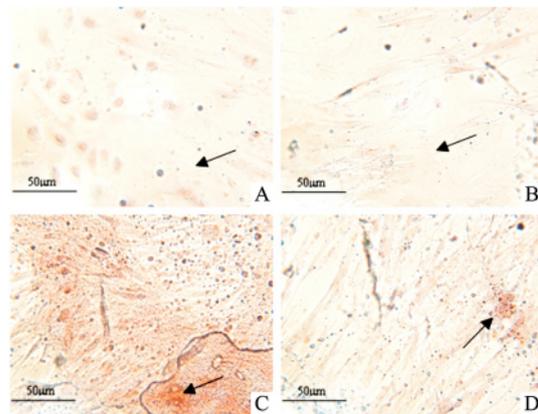


图7 茜素红 S 染色检测各组 HAEC 钙化沉积 ×400
A: 空白组; B: GDF11 组; C: 钙化组; D: GDF11 + 钙化组; 箭头指示粉红色附着处为钙化沉积

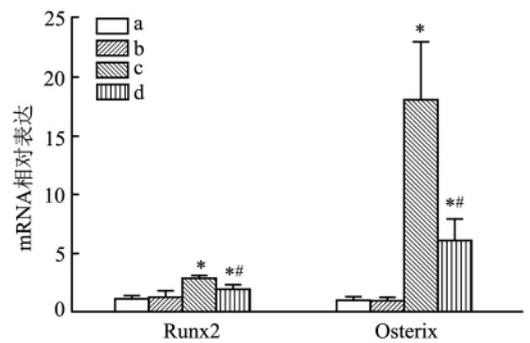


图8 RT-PCR 检测各组 HAEC 内 Runx2、Osterix 相对基因表达($n = 3$)
a: 空白组; b: GDF11 组; c: 钙化组; d: GDF11 + 钙化组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与钙化组比较: # $P < 0.05$

氮和 C 型尿钠肽,从而调控瓣膜间质细胞生长分化,抑制间质细胞钙化。血管平滑肌细胞是血管间质成分的一种,亦受内皮细胞分泌物质的调控。因此,研究动脉内膜的钙化具有更显著的现实意义。有研究表明高磷或高糖环境促进 HAEC 成骨分化是血管钙化机制之一^[11-12],所以抑制内皮细胞向成骨分化的过程是抑制内膜钙化的重要机制之一,选取 HAEC 为研究对象,并对其钙化进程中所发生的成骨分化展开研究,具有重要的临床意义。

本研究中钙化模型不同于以往已报道的是,既往常用 10 mmol/L β -甘油磷酸诱导血管平滑肌细胞钙化^[13],而 HAEC 需用更高浓度 β -甘油磷酸(30 mmol/L)才能发生显著钙化。诱导 HAEC 钙化后,BMP2、BMP4 蛋白表达上调,其上游的成骨转录因子 Runx2、Osterix 表达也上调,说明该钙化诱导方案可能经 Runx2/Osterix 途径^[14]。在该钙化模型中,GDF11 的蛋白和基因表达同时上调。而目前研究^[15-16]内源 GDF11 表达者多聚焦于临床范畴,且尚无统一结论,可能与不同细胞系、不同疾病、年龄、GDF11 的检测方法等混杂因素有关^[17-18]。但钙化诱导后所表现的 GDF11 升高是负反馈性上调抑制钙化还是仅作为一种促钙化标记物正反馈性上调不得而知。本研究便在钙化诱导之前补充外源 GDF11 因子,发现 BMP2、BMP4 均下调;另外,外源 GDF11 也下调钙化过程中的 Runx2、Osterix 基因表达水平。茜素红染色提示 GDF11 从大体层面抑制了钙化的发生,以上结果表明 GDF11 可能通过 Runx2/Osterix 途径来抑制钙化。钙化组的 GDF11 表达虽上调,但钙化相关蛋白并未下调,说明高甘油磷酸诱导钙化所致内源 GDF11 的上调并不能抑制钙化的发生,在补充一定浓度的外源 GDF11 后可见钙化相关蛋白下调,钙化沉积也减少。可能因为内源 GDF11 的浓度不足以抑制钙化或外源 GDF11 通过反馈性抑制内源 GDF11 的表达来抑制钙化。

研究表明高浓度 β -甘油磷酸、地塞米松、L-抗坏血酸可诱导 HAEC 钙化,可能通过成骨转录因子 Runx2/Osterix 正性调节下游钙化蛋白的表达,为后续研究奠定了基础。并发现外源 GDF11 可能通过 Runx2/Osterix 途径抑制 HAEC 钙化,本研究证实 GDF11 在体外可抑制 HAEC 钙化的进展,为血管内膜钙化的治疗提供了干预的靶点,但具体机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, et al. Has our understanding of

- calcification in human coronary atherosclerosis progressed[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, 34(4): 724-36.
- [2] Lindman B R, Bonow R O, Otto C M. Current management of calcific aortic stenosis[J]. *Circ Res* 2013, 113(2): 223-37.
- [3] Evrard S, Delanaye P, Kamel S, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers[J]. *Clin Chim Acta* 2015, 438(1): 401-14.
- [4] Bardeesi A S A, Gao J, Zhang K, et al. A novel role of cellular interactions in vascular calcification[J]. *J Transl Med* 2017, 15(1): 95.
- [5] Zimmers T A, Jiang Y, Wang M, et al. Exogenous GDF11 induces cardiac and skeletal muscle dysfunction and wasting[J]. *Basic Res Cardiol* 2017, 112(4): 48.
- [6] Liu W, Zhou L, Zhou C, et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation[J]. *Nat Commun* 2016, 7: 12794.
- [7] Duran J, Troncoso M F, Lagos D, et al. GDF11 modulates Ca^{2+} -dependent Smad2/3 signaling to prevent cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Int J Mol Sci* 2018, 19(5): E1508.
- [8] Lidar L, Demer M D. Vascular calcification pathobiology of a multifaceted disease[J]. *Circulation* 2008, 117: 2938-48.
- [9] Gould S T, Sriganapalan S, Simmons C A, et al. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease[J]. *Circ Res* 2013, 113(2): 186-97.
- [10] Yip C Y, Blaser M C, Mirzaei Z, et al. Inhibition of pathological differentiation of valvular interstitial cells by C-type natriuretic peptide[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31(8): 1881-9.
- [11] Yao Y, Jumabay M, Ly A, et al. A role for the endothelium in vascular calcification[J]. *Circ Res* 2013, 113(5): 495-504.
- [12] Bouabdallah J, Zibara K, Jssa H, et al. Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulphate promote vascular calcification through interleukin-8 secretion[J]. *Nephrol Dial Transplant* 2019, 34(7): 1125-34.
- [13] Kakutani Y, Shioi A, Shoji T, et al. Oncostatin promotes osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells through JAK3-STAT3 pathway[J]. *J Cell Biochem* 2015, 116(7): 1325-33.
- [14] Li Z, Wang W, Xu H, et al. Effects of altered CXCL12/CXCR4 axis on BMP2/Smad/Runx2/Osterix axis and osteogenic gene expressions during osteogenic differentiation of MSCs[J]. *Am J Transl Res* 2017, 9(4): 1680-93.
- [15] Liang X, Dou X, Tian L, et al. A renewed focus on GDF11 level fluctuation in human serum in relation to physical examination indicators[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020, 75(6): 1095-102.
- [16] Tanaka R, Sugiura H, Yamada M, et al. Physical inactivity is associated with decreased growth differentiation factor 11 in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018, 13: 1333-42.
- [17] Fadini GP, Menegazzo L, Bonora B M, et al. Effects of age, diabetes, and vascular disease on growth differentiation factor 11:

first-in-human study[J]. *Diabetes Care* 2015 38(8) : e118 - 9.
[18] Semba R D , Zhang P , Zhu M , et al. Relationship of circulating growth and differentiation factors 8 and 11 and their antagonists as

measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with age and skeletal muscle strength in healthy adults[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* ,2019 74(1) : 129 - 36.

Effect of exogenous GDF11 on calcification of human aortic endothelial cells

Sheng Ying¹ , Zhang Chenming¹ , Chen Liang² , et al

(¹Dept of Cardiology , Wuxi Clinical College , Anhui Medical University , Wuxi 214044;

²Dept of Cardiology , Joint Temporary Support Force of the Chinese People's Liberation Army , Wuxi 214044)

Abstract Objective To establish an in vitro human aortic endothelial cell (HAEC) calcification model and explore the effect of exogenous growth differentiation factor 11 (GDF11) on calcification. **Methods** Low-concentration (10 mmol/L) /high-concentration (30 mmol/L) β -glycerol phosphate + 100 nmol/L dexamethasone + 50 μ g/ml L-ascorbic acid were used to stimulate HAEC , and an effective calcification induction protocol was selected. Different concentrations (0 , 30 , 50 , 100 ng/ml) of GDF11 were used at different concentrations (0 , 30 , 50 , 100 ng/ml) to stimulate HAEC at different times (0 , 8 , 24 , 48 h) , and the effective concentration and time of GDF11 were selected; HAEC was divided into blank group , GDF11 group , calcification group , GDF11 + calcification group. Western blot was used to detect the expression of bone morphogenetic protein (BMP) 2 , BMP4 , and GDF11; cell immunofluorescence was used to detect the expression of GDF11; RT-PCR was used to detect the gene expression of Runx2 , Osterix , and GDF11; Alizarin Red S staining was used to detect calcification deposition. **Results** ① The expression levels of GDF11 , BMP4 , and BMP2 proteins in the high-concentration group were higher than those in the blank group ($P < 0.05$); the Runx2 , Osterix , and GDF11 gene expression levels in the high-concentration group were higher than those in the blank group ($P < 0.05$); alizarin red staining showed that calcium deposition increased in the high-concentration group compared with the blank group; ② Expression of BMP2 , BMP4 protein decreased after pretreatment with 100 ng/ml GDF11 for 24 h ($P < 0.05$); ③ Compared with the calcification group , the expression of BMP2 and BMP4 protein in the GDF11 + calcification group decreased ($P < 0.05$) , and there was no significant difference between the GDF11 group and the blank group; compared with the calcification group , the calcification deposition of GDF11 + calcification group was reduced , and there was no significant difference between the GDF11 group and the blank group; the gene levels of Runx2 and Osterix in the GDF11 + calcification group were lower than those in the calcification group ($P < 0.05$) , but there was no significant difference between the GDF11 group and the blank group. **Conclusion** GDF11 can inhibit calcification of HAEC and may be associated with the inhibition of osteogenic differentiation in HAEC.

Key words growth differentiation factor 11; vascular calcification; human aortic endothelial cells