

# Ghrelin 在维生素 D<sub>3</sub> 和尼古丁诱导大鼠血管钙化中的作用

马涛<sup>1</sup>, 王倩<sup>1</sup>, 程治源<sup>2</sup>, 叶挺<sup>2</sup>, 张宸铭<sup>1</sup>, 盛瑛<sup>1</sup>, 宗刚军<sup>1,2</sup>

**摘要** **目的** 建立大鼠血管钙化(VC)模型并探讨 Ghrelin 在 VC 中的作用。**方法** 将 40 只 8 周龄 SD 大鼠随机分为 4 组: 钙化组、对照组、钙化 + 低浓度 Ghrelin 组、钙化 + 高浓度 Ghrelin 组。钙化组用尼古丁灌胃(溶解于花生油中)联合维生素 D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)溶解于无水乙醇肌肉注射,对照组仅用花生油和无水乙醇做相同处理,钙化 + 低浓度 Ghrelin 组和钙化 + 高浓度 Ghrelin 组分别在 VD<sub>3</sub> 和尼古丁处理基础上分别腹腔注射 50 μg/kg、100 μg/kg 剂量的 Ghrelin 每日 1 次,连续 4 周。用 Von Kossa 染色观察大鼠胸主动脉 VC 程度,ELISA 法测血清钙离子(Ca<sup>2+</sup>)、碱性磷酸酶(ALP)及胸主动脉骨形态发生蛋白-2、4(BMP-2、BMP-4)含量,免疫组化法检测胸主动脉 BMP-2、BMP-4 表达。Western blot 法检测 4 组 BMP-2、BMP-4 和 Ghrelin 的表达。**结果** 钙化组和对照组 Von Kossa 染色证实 VC 模型建立成功,且高浓度 Ghrelin 比低浓度 Ghrelin 有更明显的抑制 VC 作用,ELISA 法测得血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP、胸主动脉 BMP-2、BMP-4 含量以及免疫组化法、Western blot 法测 BMP-2、BMP-4 蛋白表达验证 Ghrelin 有抑制 VC 的作用,高浓度 Ghrelin 抑制 VC 更加明显( $P < 0.05$ )。Western blot 检测 4 组 Ghrelin 表达情况,其中钙化组和对照组相比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 维生素 D<sub>3</sub> 联合尼古丁可以成功建立大鼠 VC 模型,Ghrelin 能够在一定程度上抑制 VC 的发展。

**关键词** Ghrelin; 大鼠; 血管钙化

**中图分类号** R 561.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1349-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.004

血管钙化(vascular calcification, VC)是高血压病、动脉粥样硬化、慢性肾衰竭以及糖尿病血管病变共同的病理学改变。有研究<sup>[1-2]</sup>表明 VC 过程复杂,与动脉粥样硬化、糖尿病和慢性肾病患者的心血

管发病率和死亡率增加有关<sup>[3]</sup>。然而,目前并没有针对 VC 特效的治疗方法。

Ghrelin 又称生长激素释放肽或胃饥饿素,是由氨基酸残基组成的小分子多肽<sup>[4-5]</sup>,在心血管系统方面,有研究<sup>[6-7]</sup>显示 Ghrelin 能够阻碍炎症细胞聚集和活化,延缓动脉粥样硬化的进展。而 VC 是动脉粥样硬化晚期继发性改变之一,由此可以推测 Ghrelin 在一定程度上可以抑制 VC 的发展。该研究拟建立大鼠 VC 模型,探讨 Ghrelin 与 VC 程度之间的作用,旨在寻找干预钙化的新靶点,为延缓 VC 进程提供新的方向。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只由江苏省血吸虫病防治研究所(无锡)提供,平均 8 周龄,体重 160~250 g;尼古丁购自美国 Merck 公司;维生素 D<sub>3</sub>(vitamin D<sub>3</sub>, VD<sub>3</sub>)购自美国 Sigma 公司,纯度 > 99%,Ghrelin 购自杭州中肽生物有限公司,纯度 > 99%;钙离子及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒均购自北京索莱宝公司;骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、BMP-4 试剂盒购自美国 R&D 公司;BMP-2、BMP-4、Ghrelin 抗体及 β-肌动蛋白抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;其他试剂由杭州联科生物公司提供。

**1.2 VC 模型的建立及实验分组** 将 40 只同一批次 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 10 只,分别为钙化组(vascular calcification, VC)、对照组(control, CON)、钙化 + 低浓度 Ghre 组(low concentration-Ghrelin, L-Ghre)、钙化 + 高浓度 Ghre 组(high concentration-Ghrelin, H-Ghre)。VC 组:第 1 天 8:00 am 用 VD<sub>3</sub> 溶解于无水乙醇(30 万 U/kg)肌肉注射,尼古丁溶解于花生油(25 mg/kg)8:00 am, 6:00 pm 各灌胃 1 次。CON 组:同样时间用同等量的无水乙醇肌肉注射,花生油灌胃。L-Ghre 组:用同钙化组相同方法建立模型的基础上给予 Ghrelin 50 μg/kg,腹腔注射,每日 1 次,持续 4 周。H-Ghre 组:在钙化模型基础上给予 Ghrelin 100 μg/kg,腹腔注射,每日 1 次,

2019-05-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371657);江苏省青年医学重点人才基金项目(编号:QNRC2016883)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学无锡临床学院心内科,无锡 214044

<sup>2</sup>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:马涛,男,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

持续4周。所有大鼠常规饲料、纯净水喂养,定期更换饲料、饮用水及垫料,每日观察并记录大鼠活力,每周称重。4周后4组大鼠称重后均在10%丙戊酸钠麻醉后心脏取血,3 000 r/min、10 min 离心后取上清液, -80 °C 保存待测。解剖大鼠取胸主动脉1 cm,10%中性福尔马林固定留待切片染色。

**1.3 Von Kossa 切片染色** 将固定于10%中性福尔马林的1 cm 胸主动脉常规脱水包埋,切片厚度5 μm 常规脱蜡至水,蒸馏水洗1 min,切片入 Von Kossa 银溶液在紫外灯下强光照射30 min 后蒸馏水再洗1 min,切片用海波溶液处理2 min 后蒸馏水冲洗3次,HE 染色复染细胞核,脱水透明,中性树胶封固。

**1.4 血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量测定** 大鼠血清离心后上清液中的 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量用 ELISA 法进行检测,具体操作步骤按照试剂盒说明进行。

**1.5 免疫组化法检测胸主动脉 BMP-2、BMP-4 表达** 石蜡包埋的血管组织切片4 μm,脱蜡洗涤,抗原修复,分别加入 BMP-2、BMP-4 抗体4 °C 过夜,复温洗涤后滴加二抗,洗涤加显色液后苏木精复染5 ~ 10 min。

**1.6 胸主动脉 BMP-2、BMP-4 含量测定** 取大鼠胸主动脉段血管组织20 mg 加入裂解液进行冰浴匀浆4 °C、3 000 r/min 离心10 min 后取上清液,用 BMP-2、BMP-4 ELISA 试剂盒测定其含量。

**1.7 胸主动脉 BMP-2、BMP-4、Ghrelin 蛋白表达**

取胸主动脉并剪成细小碎片,加入终浓度为1 mmol/L 的 PMSF,每20 mg 组织加入200 μl 的 RIPA 裂解液并震荡裂解液,玻璃器匀浆至充分裂解,12 000 r/min 离心5 min 取上清液,加入上样缓冲液并煮沸,再次离心,其余步骤按照 Western blot 方法进行。

**1.8 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 5.01 进行统计分析,变量以  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用 *t* 检验,用双侧检验,多组间比较采用方差分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Von Kossa 染色观察4组大鼠胸主动脉 VC 程度** 通过 Von Kossa 染色切片观察可见 CON 组血管壁呈红色未见黑褐色钙盐沉积,VC 组胸主动脉壁中层可见大量黑褐色至深黑色钙盐沉积,H-Ghre 组钙化程度小于 L-Ghre 组,两组钙化程度均明显小于 VC 组,并且高于 CON 组,见图1。

**2.2 4组大鼠体质量及血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量测定** 4组体质量差异无统计学意义 (*F* = 0.998, *P* > 0.05),ELISA 法检测结果显示: L-Ghre 组血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量均高于 H-Ghre 组和 CON 组,但低于 VC 组血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量,差异有统计学意义 (*F* = 64.102, *P* < 0.05; *F* = 66.390, *P* < 0.05)。见表1。

**2.3 相关钙化因子的表达** 免疫组化法检测4组大鼠胸主动脉 BMP-2、BMP-4 的表达: BMP-2、BMP-4

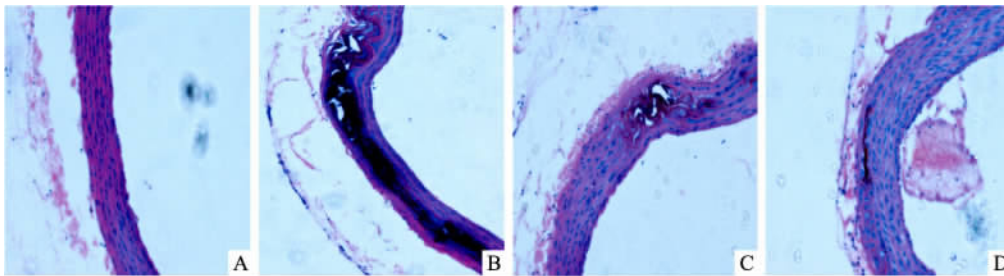


图1 4组大鼠胸主动脉切片 Von Kossa 染色结果 ×200  
A: CON 组; B: VC 组; C: L-Ghre 组; D: H-Ghre 组

表1 4组体质量及 ELISA 法测4组血清 Ca<sup>2+</sup>、ALP 含量比较 (n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

项目	VC 组	CON 组	L-Ghre 组	H-Ghre 组	F 值
体质量 (g)	385.10 ± 12.65	359.10 ± 61.23 <sup>#</sup>	349.70 ± 32.64 <sup>#Δ</sup>	356.70 ± 10.25 <sup>* #Δ</sup>	0.998
血清 Ca <sup>2+</sup> 含量 (mg/dl)	17.81 ± 1.04	5.54 ± 2.09 <sup>#</sup>	13.30 ± 1.41 <sup>#Δ</sup>	8.47 ± 1.29 <sup>* #Δ</sup>	64.102
血清 ALP 含量 (U/L)	172.00 ± 15.21	45.95 ± 14.71 <sup>#</sup>	117.10 ± 18.05 <sup>#Δ</sup>	51.58 ± 17.35 <sup>* #Δ</sup>	66.390

与 L-Ghre 组比较: \* *P* < 0.05; 与 VC 组比较: # *P* < 0.05; 与 CON 组比较: Δ *P* < 0.05

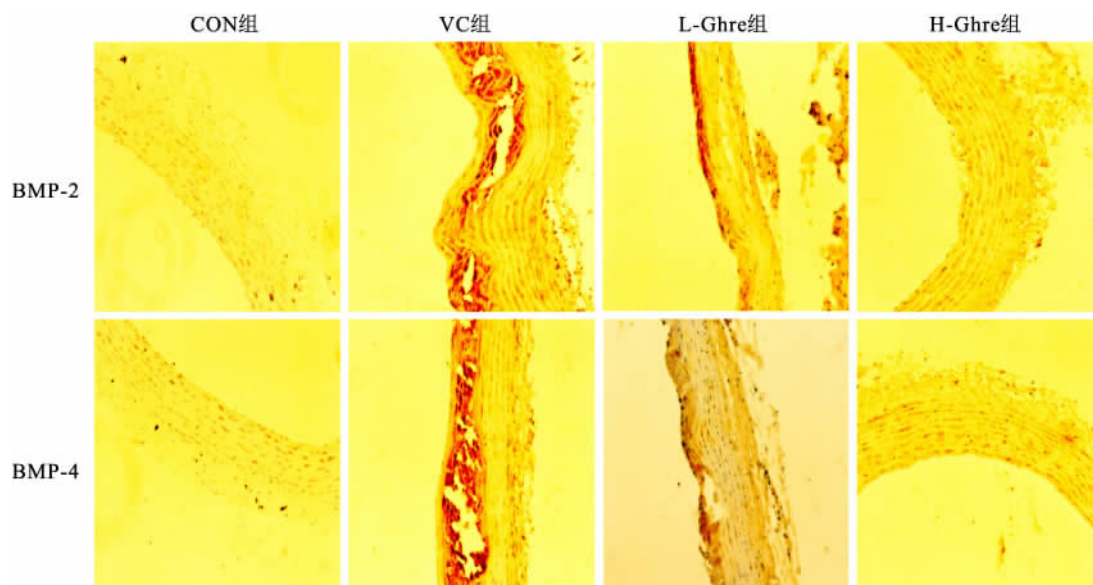


图2 4组大鼠免疫组化法测胸主动脉上BMP-2、BMP-4表达 ×200

表2 4组大鼠胸主动脉BMP-2、BMP-4含量 (n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

钙化因子	VC组	CON组	L-Ghre组	H-Ghre组	F值
BMP-2含量 (pg/dl)	175.38 ± 23.85	94.50 ± 14.14 <sup>#</sup>	144.83 ± 19.20 <sup>#△</sup>	125.34 ± 9.04 <sup>* #△</sup>	13.792
BMP-4含量 (pg/dl)	144.30 ± 17.90	89.67 ± 16.04 <sup>#</sup>	131.30 ± 12.35 <sup>#△</sup>	115.60 ± 8.46 <sup>* #△</sup>	11.472

与L-Ghre组比较: \* P < 0.05; 与VC组比较: # P < 0.05; 与CON组比较: △ P < 0.05

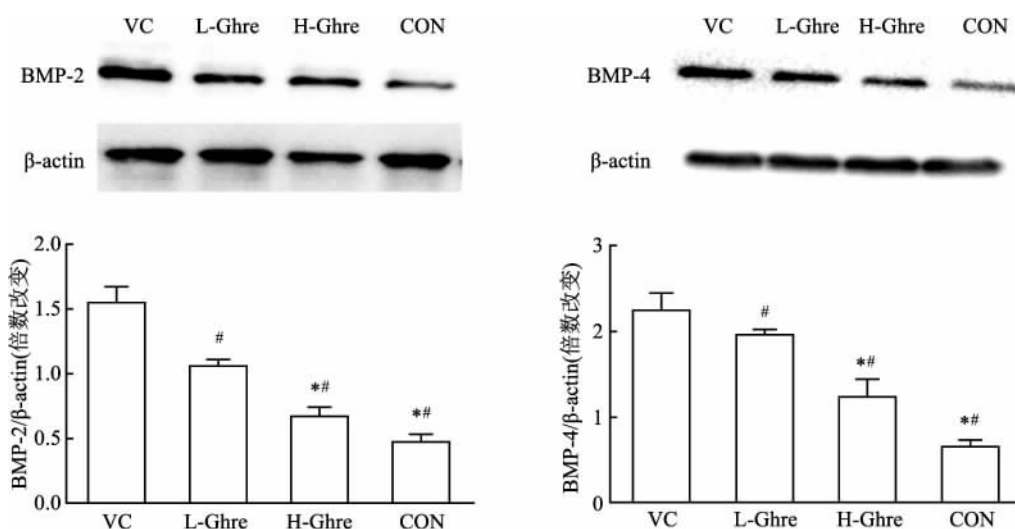


图3 Western blot检测4组大鼠胸主动脉BMP-2、BMP-4的表达

与L-Ghre组比较: \* P < 0.05; 与VC组比较: # P < 0.05

在CON组几乎无表达,在VC组表达最明显呈棕黄色,H-Ghre组BMP-2、BMP-4的表达低于L-Ghre组(图2)。ELISA法测4组大鼠胸主动脉BMP-2、BMP-4含量,VC组含量最高,L-Ghre组高于H-Ghre组,CON组最低,差异有统计学意义( $F = 13.792, P < 0.05; F = 11.472, P < 0.05$ ) (表2)。Western blot结果显示:VC组中BMP-2、BMP-4的表达均较其他

三组明显升高,H-Ghre组与L-Ghre组比较BMP-2、BMP-4表达均降低且高于CON组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图3。

#### 2.4 4组大鼠胸主动脉 Ghrelin 蛋白表达差异检测

相比于CON组,VC组给予尼古丁灌胃联合VD<sub>3</sub>肌注,Western blot结果显示VC组和CON组Ghrelin蛋白表达相比无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图4。说

明实验所用的建模方法并不会对大鼠体内 Ghrelin 水平产生明显影响。

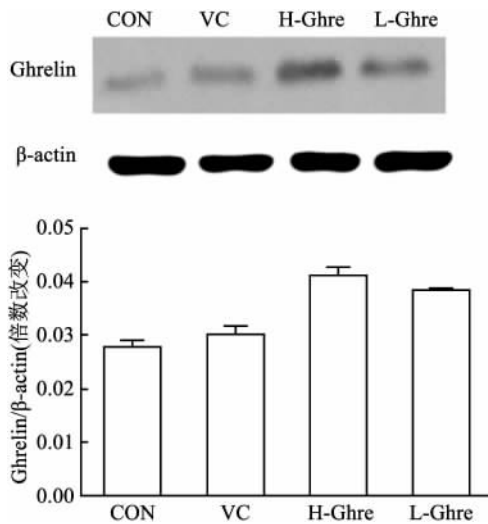


图4 Western blot 检测 4 组大鼠胸主动脉 Ghrelin 的表达

### 3 讨论

随着社会老龄化的日益加剧,VC 显著增加了心血管病的发病率,因此受到越来越多的关注。VC 是临床上比较常见的疾病,尤其在肾功能衰竭、脂质代谢异常及糖尿病血管病变的患者中更常见,既往的观点认为 VC 是钙盐在血管壁被动沉积的过程,是钙磷代谢紊乱的结果,炎症反应、细胞凋亡会加剧 VC 化进展<sup>[8]</sup>。近年研究<sup>[9]</sup>表明 VC 是多因素参与的与骨细胞代谢、软骨发育相关的一个可以主动调控的过程。本实验通过给予 VD<sub>3</sub> 和尼古丁建立大鼠 VC 模型,利用 Von Kossa 染色可以明显看到动脉中层有大量黑褐色钙盐沉积,通过 ELISA 法、免疫组化法以及 Western blot 方法检测可以看到钙离子、ALP 及 BMP-2、BMP-4 等钙化相关指标明显增高,证实了可以通过 VD<sub>3</sub> 联合尼古丁可以成功建立大鼠 VC 模型。通过对钙化组和对照组的 Ghrelin 表达水平的检测,发现建模方法并不会影响大鼠自身 Ghrelin 水平。此外在建立 VC 模型基础上,实验组给予不同剂量的 Ghrelin 可以发现 L-Ghre 组、H-Ghre 组以及 VC 组之间钙化指标存在差异,H-Ghre 组相关钙化指标低于 L-Ghre 组和 VC 组,并且有统计学意义,说明 Ghrelin 在一定程度上可以减轻 VC 的发展。

目前有关 VC 发生的机制更多倾向于多因素参与的并且是可以主动调控的过程,包括细胞表型转

化(平滑肌细胞转化为成骨细胞)、炎症细胞的迁移与活化、细胞的自噬和凋亡等有关。本研究表明外源性 Ghrelin 在一定程度上有减弱钙化的作用且高剂量 Ghrelin 作用更明显,但其机制目前并没有完全明确,有国外研究表明通过抑制细胞凋亡因子 Bax 和 Caspase-3 的表达可以减轻细胞钙化,但并不是唯一机制<sup>[10-11]</sup>,也可以通过激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK1/2) 和磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) /蛋白激酶 B( protein kinase B, Akt) 来抑制细胞凋亡减轻钙化<sup>[12-13]</sup>,因此可以猜测 Ghrelin 抑制 VC 的机制之一是通过激活 ERK1/2 和 PI3K/Akt 通路抑制 Bax、Caspase-3 等凋亡因子表达最终抑制 VC 的进展。脱酰基 Ghrelin 是 Ghrelin 发挥生物学效应的主要形式,有研究<sup>[14]</sup>显示脱酰基 Ghrelin 可以通过上调非编码 RNA-426 的表达增加沉默信息调节因子-1 和超氧化物的水平歧化酶-2 在外周血管内皮细胞中产生来保护内皮细胞抗氧化损伤,而血管内皮细胞氧化损伤是导致血管粥样硬化和钙化的启动因素之一,因此可以推测这或许是 Ghrelin 抑制 VC 的另一个可能机制。目前,有关 Ghrelin 的研究尚处于起步阶段,而且目前研究仅限于体外细胞水平,本实验通过建立大鼠 VC 模型更加逼真的模拟了体内环境,较体外实验有一定说服力,但存在 Ghrelin 浓度梯度分组少,未准确提出 Ghrelin 抑制大鼠 VC 的可能药物浓度范围,这有待进一步实验探索。目前 Ghrelin 在体内的作用机制尚不完全明确,但 Ghrelin 为临床上高危钙化患者减轻钙化提供了一个方向,要想作为临床上的治疗手段则需要进行更广泛的研究。

### 参考文献

- [1] Tintut Y, Hsu J J, Demer L L. Lipoproteins in cardiovascular calcification: potential targets and challenges [J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 5: 172.
- [2] Pillai C L, Li S, Romay M, et al. Cardiac fibroblasts adopt osteogenic fates and can be targeted to attenuate pathological heart calcification [J]. Cell Stem Cell, 2017, 20(2): 218-32.
- [3] Benz K, Hilgers K F, Daniel C, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of inflammation [J]. Int J Nephrol, 2018, 2018: 4310379.
- [4] Zhang M, Qu X, Yuan F, et al. Ghrelin receptor deficiency aggravates atherosclerotic plaque instability [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2015, 20: 604-13.
- [5] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, et al. Structure, regulation and

- function of ghrelin [J]. *J Biochem*, 2012, 151(2): 119–28.
- [6] Demer L L, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 715–23.
- [7] Xu M, Liu L, Song C, et al. Ghrelin improves vascular autophagy in rats with vascular calcification [J]. *Life Sci*, 2017, 179: 23–9.
- [8] Kapustin A N, Davies J D, Reynolds J L, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization [J]. *Circ Res*, 2011, 109(1): e1–12.
- [9] Nitschke Y, Rutsch F. Inherited arterial calcification syndromes: etiologies and treatment concepts [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(4): 255–70.
- [10] Zhang G G, Cai H Q, Li Y H, et al. Ghrelin protects heart against ERS-induced injury and apoptosis by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Peptides*, 2013, 48: 156–65.
- [11] Hou M, Song Y, Li Z, et al. Curcumin attenuates osteogenic differentiation and calcification of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420(1–2): 151–60.
- [12] Pei X M, Yung B Y, Yip S P, et al. Protective effects of desacyl ghrelin on diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(2): 293–306.
- [13] Shin H J, Kim H, Oh S, et al. AMPKSKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy [J]. *Nature*, 2016, 534(7608): 553–7.
- [14] Zhang M, Qu X, Yuan F, et al. Ghrelin receptor deficiency aggravates atherosclerotic plaque instability and vascular inflammation [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2015, 20: 604–13.

## Role of Ghrelin on the vascular calcification induced by vitamin D<sub>3</sub> combined with nicotine in rats

Ma Tao<sup>1</sup>, Wang Qian<sup>1</sup>, Cheng Zhiyuan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>*Dept of Cardiology, Wuxi Clinical Hospital, Anhui Medical University, Wuxi 214044;*

<sup>2</sup>*Dept of Cardiology, 904 Hospital of PLA, Wuxi 214044)*

**Abstract Objective** To establish the rat vascular calcification (VC) model and explore the effect of Ghrelin on vascular calcification. **Methods** Forty sprague dawley rats aged 8 weeks were randomly divided into four groups: calcification group, control group, calcification + low concentration Ghrelin group, calcification + high concentration Ghrelin group. In the calcification group, nicotine was intragastrically administered (dissolved in peanut oil) and vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) dissolved in anhydrous ethanol was intramuscularly injected, calcification + low concentration of Ghrelin group and calcification + high concentration of Ghrelin group was intraperitoneally injected with 50 μg/kg and 100 μg/kg Ghrelin once daily for 4 weeks on the basis of vitamin D<sub>3</sub> and nicotine treatment. The degree of calcification of rat thoracic aorta was observed by Von Kossa section staining. ELISA was used to measure serum calcium (Ca<sup>2+</sup>), alkaline phosphatase (ALP) and thoracic aortic bone morphogenetic protein-2, 4 (BMP-2, BMP-4) content, immunohistochemistry was used to detect the expression of BMP-2 and BMP-4 in the thoracic aorta. Western blot assay was used to detect the expression of BMP-2, BMP-4 and Ghrelin. **Results** The calcification group and the control group confirmed that the vascular calcification model was established successfully by Von Kossa staining, and the high concentration of Ghrelin inhibited vascular calcification more than the low concentration of Ghrelin. The serum Ca<sup>2+</sup>, ALP, thoracic aorta BMP-2, BMP-4 content were measured by ELISA method. The BMP-2, BMP-4 protein expression confirmed that Ghrelin inhibited vascular calcification by immunohistochemistry and Western blot, high concentration of Ghrelin inhibited vascular calcification more significantly ( $P < 0.05$ ). Western blot results demonstrated that there was no significant difference between the calcification group and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Nicotine combined with vitamin D<sub>3</sub> can establish rat vascular calcification model, and hrelin can inhibit the development of calcification.

**Key words** Ghrelin; rat; vascular calcification