

## 吴茱萸次碱通过Sirt1改善血管平滑肌细胞钙化

邵静, 陈安, 张秀丽, 杨平珍

(南方医科大学珠江医院心血管内科//珠江医院心脏中心实验室, 广东 广州 510280)

**摘要:**【目的】探讨吴茱萸次碱对血管平滑肌细胞钙化的作用及机制。【方法】本研究采用大鼠血管平滑肌细胞钙化体外模型,用不同浓度的吴茱萸次碱处理细胞,qRT-PCR检测成骨样分化基因*Runx2*、*BMP2*和*Osterix*的表达和茜素红染色测细胞钙化程度。此外,观察吴茱萸次碱对血管平滑肌细胞Sirt1表达水平的影响以及Sirt1抑制剂对细胞钙化的影响。【结果】茜素红染色及钙离子浓度定量实验均显示不同浓度的吴茱萸次碱可明显地改善高磷高钙诱导的大鼠血管平滑肌细胞的钙化程度(136±10、75±6、52±6、31±5、 $P < 0.05$ )。使用吴茱萸次碱明显降低血管平滑肌细胞成骨样分化的分子标志物ALP活性,下调*Runx2*(2.85±0.25、1.75±0.18、1.62±0.13、1.36±0.16、 $P < 0.05$ )、*BMP2*(3.2±0.32、1.85±0.17、1.65±0.15、1.43±0.12、 $P < 0.05$ )和*Osterix*(2.60±0.27、1.82±0.16、1.55±0.15、1.36±0.17;  $P < 0.05$ )的表达水平,说明吴茱萸次碱可抑制血管平滑肌细胞成骨样分化过程。另外,高磷高钙可下调血管平滑肌细胞Sirt1的表达水平,qRT-PCR和Western blot结果证实吴茱萸次碱可明显地上调Sirt1 mRNA(0.35±0.06、0.75±0.11; 0.22±0.08、0.87±0.13;  $P < 0.05$ )和Sirt1的蛋白(0.38±0.09、0.71±0.13;  $P < 0.05$ )的表达水平。钙定量结果显示Sirt1抑制剂EX-527能阻断吴茱萸次碱改善血管平滑肌细胞钙化的作用(138±13、36±7、87±8、 $P < 0.05$ )。【结论】吴茱萸次碱可通过调节Sirt1改善血管平滑肌细胞钙化。

**关键词:**血管钙化;血管平滑肌细胞;吴茱萸次碱;沉默信息调节因子1

中图分类号:R364 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)03-0387-06

## Rutecarpine Attenuates Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via Sirt1

SHAO Jing, CHEN An, ZHANG Xiu-li, YANG Ping-zhen

(Department of Cardiology// Laboratory of Heart Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

Correspondence to: YANG Ping-zhen, E-mail: y\_pingzhen@163.com

**Abstract:** 【Objective】 This study aims to investigate whether rutecarpine has an effect on calcification of VSMC and its underlying mechanism. 【Methods】 In vitro model of rat VSMC calcification was used in this study. Rutecarpine at different concentrations was used to treat cultured rat VSMC. The expression of *Runx2*, *BMP2* and *Osterix* was analyzed by qRT-PCR and mineral deposition was detected by alizarin red staining. In addition, we examined the effect of rutecarpine on Sirtuin-1 (Sirt1) expression in VSMC and the effect of Sirt1 inhibitor on VSMC calcification. 【Results】 Alizarin red staining and calcium content assay showed that rutecarpine at different concentrations significantly reduced calcification of rat VSMC induced by high phosphorus and high calcium (136±10, 75±6, 52±6, 31±5.29,  $P < 0.05$ ). Usage of rutecarpine decreased the activity of ALP, an osteogenic differentiation molecular marker, and down-regulated the expression of *Runx2* (2.85±0.25, 1.75±0.18, 1.62±0.13, 1.36±0.16,  $P < 0.05$ ), *BMP2* (3.2±0.32, 1.85±0.17, 1.65±0.15, 1.43±0.12,  $P < 0.05$ ) and *Osterix* (2.60±0.27, 1.82±0.16, 1.55±0.15, 1.36±0.17,  $P < 0.05$ ), suggesting that rutecarpine inhibited osteogenic differentiation of VSMC. In addition, high phosphorus and high calcium down-regulated the expression of Sirt1 in VSMC. qRT-PCR and western blot analysis confirmed that rutecarpine up-regulated the expression of Sirt1 at both mRNA (0.35±0.06, 0.75±0.11; 0.22±0.08, 0.87±0.13,  $P < 0.05$ ) and protein levels (0.38±0.09, 0.71±

收稿日期:2019-01-21

基金项目:广东省科技计划项目(2013B021800323),广东省科普计划项目(2014A020212191)

作者简介:邵静,博士研究生,研究方向:心血管疾病机制,E-mail:841192216@qq.com;杨平珍,通信作者,教授,博士生导师,

E-mail: y\_pingzhen@163.com

0.13,  $P < 0.05$ ). Quantification of calcium content analysis showed inhibition of Sirt1 by EX-527 blocked the inhibitory effect of rutecarpine on VSMC calcification ( $138 \pm 13$ ,  $36 \pm 7$ ,  $87 \pm 8$ ,  $P < 0.05$ ). [Conclusion] We demonstrate that rutecarpine attenuates VSMC calcification via up-regulation of Sirt1.

**Key words:** vascular calcification; vascular smooth muscle cells; rutecarpine; sirtuin-1

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3): 387-392]

血管钙化(vascular calcification)是钙磷矿物质异常沉积于血管壁的过程,常见于慢性肾病,动脉粥样硬化和糖尿病患者,常导致血管硬度增加,弹性下降和顺应性变差,是心血管疾病的独立危险因素<sup>[1-3]</sup>。近些年的研究发现血管钙化并非传统认为的钙磷矿物质被动沉积过程,而是受基因主动调控的过程,与骨生成过程相似<sup>[4-6]</sup>。目前临床尚未有效治疗血管钙化的方法。吴茱萸次碱(rutecarpine, Rut)是从中药吴茱萸中提取的重要生物活性碱,具有抗炎,抗血小板聚集等心血管保护效应。研究表明Rut可抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖<sup>[7]</sup>,然而Rut是否影响血管平滑肌细胞钙化尚不清楚。Sirtuin-1(Sirt1)是依赖于NAD<sup>+</sup>的组蛋白去乙酰化酶,属于Sirtuin蛋白家族成员,可抑制血管平滑肌细胞钙化<sup>[8]</sup>。本研究通过采用血管平滑肌细胞钙化模型,研究Rut抗血管平滑肌细胞钙化的作用及Sirt1分子机制,从而为血管钙化的防治提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

细胞培养试剂、TRIzol试剂购自于Life Technology公司;EX-527、Rut、茜素红、 $\beta$ -甘油磷酸(beta-glycerophosphate, BGP)来自Sigma公司;逆转录试剂盒、SYBR green试剂盒购自Takara公司;BCA蛋白定量试剂盒和Western blot发光试剂盒购自于Pierce公司;Sirt1抗体购自于Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 细胞培养

SPF级雄性大鼠(150~180 g)购于南方医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2016-0041。参照explant方法分离SD大鼠主动脉血管平滑肌细胞<sup>[9]</sup>。取大鼠主动脉,剔除血管的外层结缔组织,将血管组织切成小块,放入普通培养基(growth medium, GM):含10%FBS的DMEM培

养液中,放置37 °C含体积分数5% CO<sub>2</sub>的培育箱培养,每周更换培养液3次。待细胞长满后传代,用钙化培养基(calcifying medium, CM):含10 mmol/L的BGP和3 mmol/L的CaCl<sub>2</sub>的DMEM培养液诱导细胞钙化<sup>[4]</sup>。加入不同浓度的Rut(0.5、1和5  $\mu$ mol/L)和Sirt1抑制剂EX-527(50  $\mu$ mol/L)处理细胞,观察Rut和抑制Sirt1对细胞钙化的影响。

### 1.3 细胞钙化检测

采用茜素红(Alizarin Red)染色测定血管平滑肌细胞钙化沉积。去除细胞培养基后,用PBS溶液洗细胞3次,常温下加入40 g/L的甲醛固定液孵育10 min,去除甲醛后加入2%茜素红(pH 4.2)溶液反应5 min,用去离子水清洗残留颜色,相差显微镜镜下拍摄染色的细胞图片。在茜素红染色的细胞中加入10%的甲酸,室温孵育5 min,用分光光度计在波长405 nm处测定样品吸光度OD值。采用邻甲酚酞络合剂(Ocresolphthalein complexone)的方法检测细胞钙离子浓度<sup>[10]</sup>。

### 1.4 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性

用0.1% Triton X-100裂解细胞后提取蛋白,加入BCA试剂测定样品的蛋白含量。将180  $\mu$ L的p-nitrophenylphosphate(p-NPP)和20  $\mu$ L的细胞裂解样品混合,于37 °C孵育反应15min,然后加入3 mol/L氢氧化钠使反应终止,用分光光度计测定波长405 nm溶液吸光度OD值。

### 1.5 荧光定量qRT-PCR

参照TRIzol试剂说明书,加入1mL的TRIzol试剂提取VSMC的总RNA。用PrimeScript RT逆转录试剂将1  $\mu$ g mRNA反转录为cDNA,然后用SYBR green试剂配制成20  $\mu$ L PCR反应体系,PCR所用的引物如下: $\beta$ -actin(forward):TGTCACCAACTGGGACGATA, $\beta$ -actin(reverse):GGGGT-GTTGAAGGTCTCAAA;Runx2(forward):GCCGGG-AATGATGAGA ACTA,Runx2(reverse):GGACCGT-CCACTGTCACTTT;BMP2(forward):GTTTGGCCT-

GAAGCAGAGAC, *BMP2* (reverse): CTCGATGGCT-TCTTCGTGAT; *Osterix* (forward): TCTCCATCTGCC-TGACTCCT, *Osterix* (reverse): GGGGCTGAAAGGT-CAGTGTA。在 StepOne Plus real-time PCR 仪上进行荧光定量 PCR。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 采用  $\Delta\Delta Ct$  的方法计算目的基因 mRNA 表达的相对量。

### 1.6 Western blot 检测蛋白的表达水平

加入细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS) 抽提血管平滑肌细胞总蛋白。95°C 加热使蛋白充分变性, 上样后进行 SDS-PAGE 胶电泳, 将蛋白样品转至 PVDF 膜, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗 Sirt1 抗体 (1:1 000) 4°C 过夜孵育, 加入二抗室温孵育 1 h, PBST 洗膜后 ECL 发光显影。

### 1.7 统计学处理

计量数据以均数  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 17.0 软件分析数据, 两组间比较采用 *t* 检验, 两组以上间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法。  $P < 0.05$  为有差异统计学意义。

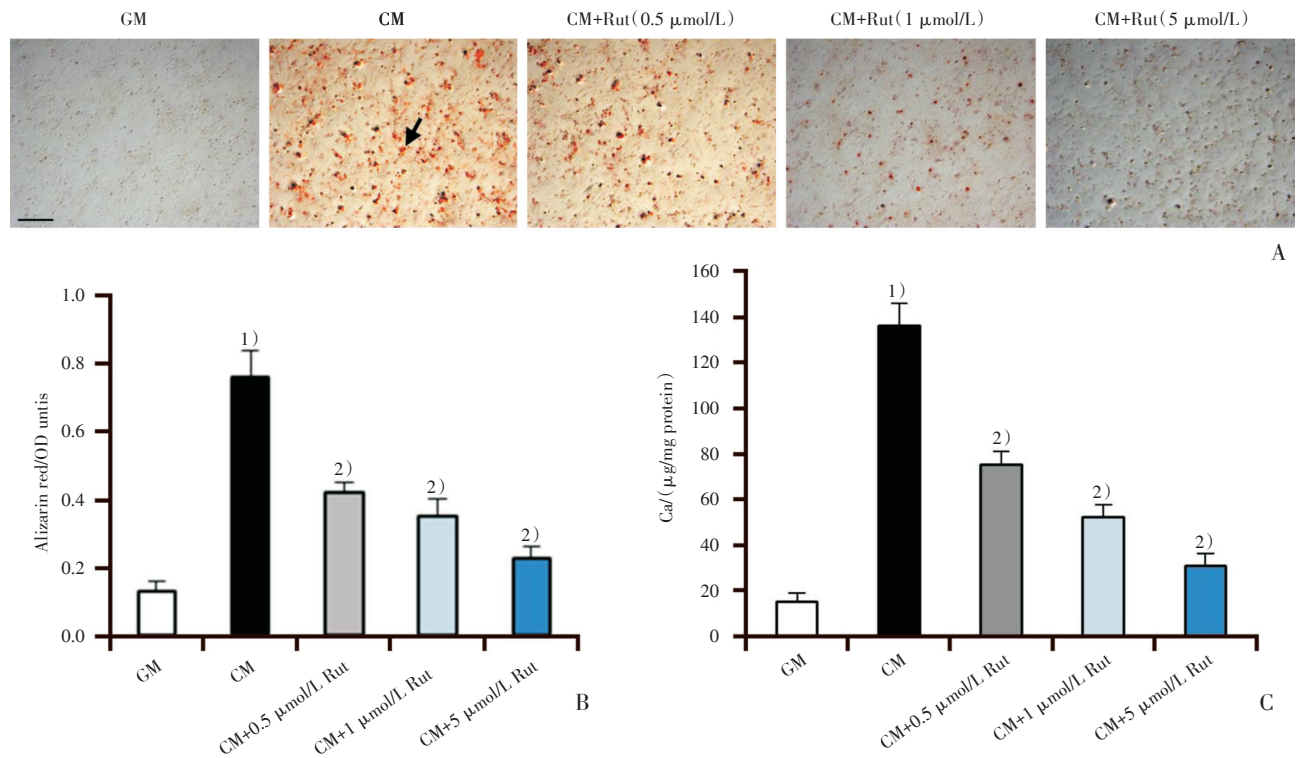
## 2 结果

### 2.1 吴茱萸次碱抑制大鼠血管平滑肌细胞钙化

分离 SD 大鼠主动脉血管平滑肌细胞, 采用不同浓度的 Rut (0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理大鼠血管平滑肌细胞 8 d, 来研究 Rut 对高磷高钙诱导的 VSMC 钙化的作用。茜红素染色和定量结果显示: 与普通培养基 (growth medium, GM) 组比较, 钙化培养基 (calcifying medium, CM) 组的血管平滑肌细胞出现明显的钙化沉积 (图 1A、B,  $P < 0.05$ ); 而不同浓度的 Rut (0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞后, 均能明显地减轻大鼠血管平滑肌细胞钙化沉积 (图 1A、B;  $P < 0.05$ )。此外, 钙离子浓度定量结果也显示: Rut 能剂量依赖性地降低细胞钙离子浓度 (图 1C;  $136 \pm 10$ 、 $75 \pm 6$ 、 $52 \pm 6$ 、 $31 \pm 5$ ,  $F = 122.28$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2.2 吴茱萸次碱抑制血管平滑肌细胞成骨样分化

现已知 VSMC 成骨样分化在血管钙化过程中发挥了关键作用, 因此我们检测了 Rut 对 VSMC



A: Mineral deposition was detected by alizarin red staining. B: Alizarin red dye was quantified by a microplate reader. C: Calcium content was measured. Compared with GM, 1)  $P < 0.05$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.05$ . Scale bar=100  $\mu\text{m}$ .  $n = 3$

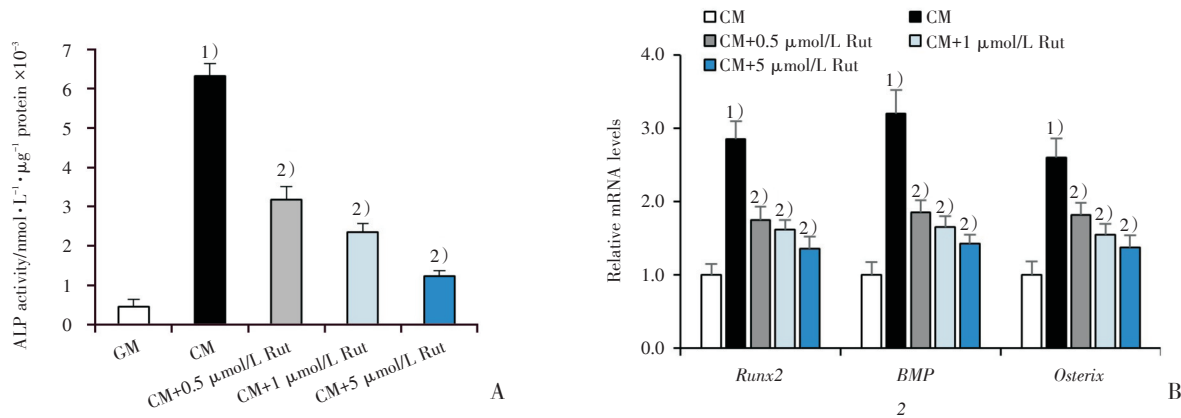
图1 吴茱萸次碱对血管平滑肌细胞钙化的作用

Fig.1 Effect of Rut on VSMC calcification

成骨样分化的分子标志物 ALP, *Runx2*, *BMP2* 和 *Osterix* 表达水平的影响。与 GM 组比较, CM 组的细胞 ALP 活性明显增高, 而使用 Rut 后能明显降低细胞的 ALP 活性(图 2A;  $P < 0.05$ )。qRT-PCR 结果显示: 高磷高钙能上调血管平滑肌细胞 *Runx2*, *BMP2* 和 *Osterix* mRNA 的表达水平, 而使用 Rut 处理后可见 *Runx2*, *BMP2* 和 *Osterix* mRNA 的表达水平明显下降[图 2B; *Runx2* ( $2.85 \pm 0.25$ ,  $1.75 \pm 0.18$ ,  $1.62 \pm 0.13$ ,  $1.36 \pm 0.16$ ,  $F = 36.865$ ,  $P < 0.001$ ), *BMP2* ( $3.2 \pm 0.32$ ,  $1.85 \pm 0.17$ ,  $1.65 \pm 0.15$ ,  $1.43 \pm 0.12$ ,  $F = 4.837$ ,  $P < 0.001$ ) 和 *Osterix* ( $2.60 \pm 0.27$ ,  $1.82 \pm 0.16$ ,  $1.55 \pm 0.15$ ,  $1.36 \pm 0.17$ ,  $F = 23.842$ ,  $P < 0.001$ )], 说明 Rut 可抑制 VSMC 成骨样分化过程。

### 2.3 吴茱萸次碱上调血管平滑肌细胞 Sirt1 表达水平

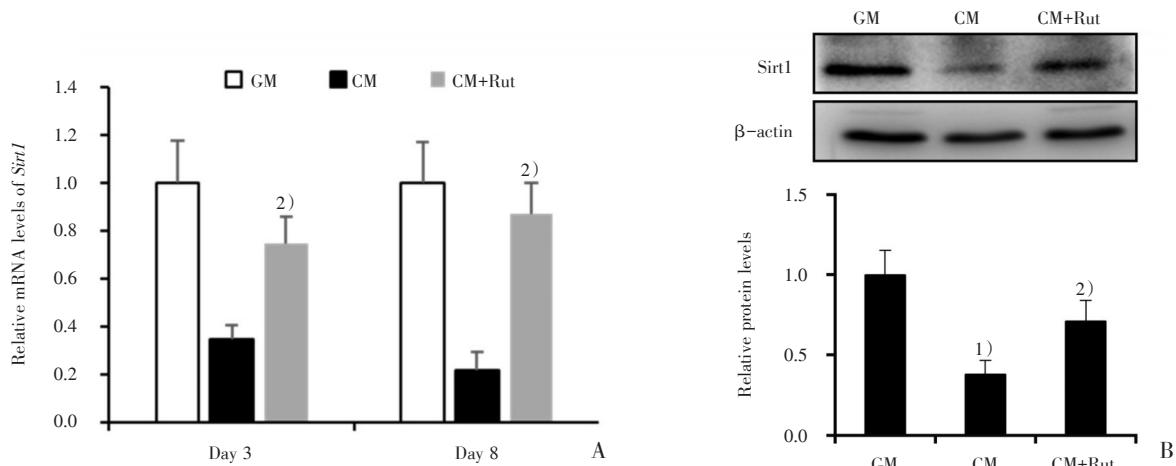
由于 Sirt1 可抑制血管钙化, 我们观察了 Rut ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) 对高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞 Sirt1 表达水平的影响。qRT-PCR 结果显示: 高磷高钙可下调血管平滑肌细胞 *Sirt1* mRNA 的表达水平, 而 Rut 可明显地上调 *Sirt1* mRNA 的表达水平(图 3A;  $0.35 \pm 0.06$ ,  $0.75 \pm 0.11$ ,  $F = 19.826$ ,  $P = 0.002$ ;  $0.22 \pm 0.08$ ,  $0.87 \pm 0.13$ ,  $F = 29.599$ ,  $P = 0.001$ )。Western blot 结果进一步证实了 Rut 可显著地上调血管平滑肌细胞 Sirt1 的蛋白表达水平(图 3B;  $0.38 \pm 0.09$ ,  $0.71 \pm 0.13$ ,  $F = 18.006$ ,  $P = 0.003$ ), 提示 Sirt1 的表达上调可能与 Rut 抑制细胞钙化有关。



A: ALP activity was determined by a microplate reader. B: *Runx2*, *BMP2* and *Osterix* mRNA expression was measured by qRT-PCR. Compared with GM, 1)  $P < 0.05$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.05$ .  $n = 3$

图2 吴茱萸次碱对血管平滑肌细胞成骨样分化的影响

Fig.2 Effect of Rut on osteogenic differentiation of VSMC



A: *Sirt1* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR. B: Sirt1 protein expression was analyzed by western blot. Compared with GM, 1)  $P < 0.05$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.05$ .  $n = 3$

图3 吴茱萸次碱对血管平滑肌细胞 Sirt1 表达水平的影响

Fig.3 Effect of Rut on Sirt1 expression in VSMC

## 2.4 抑制 Sirt1 阻断吴茱萸次碱减轻血管平滑肌细胞钙化的作用

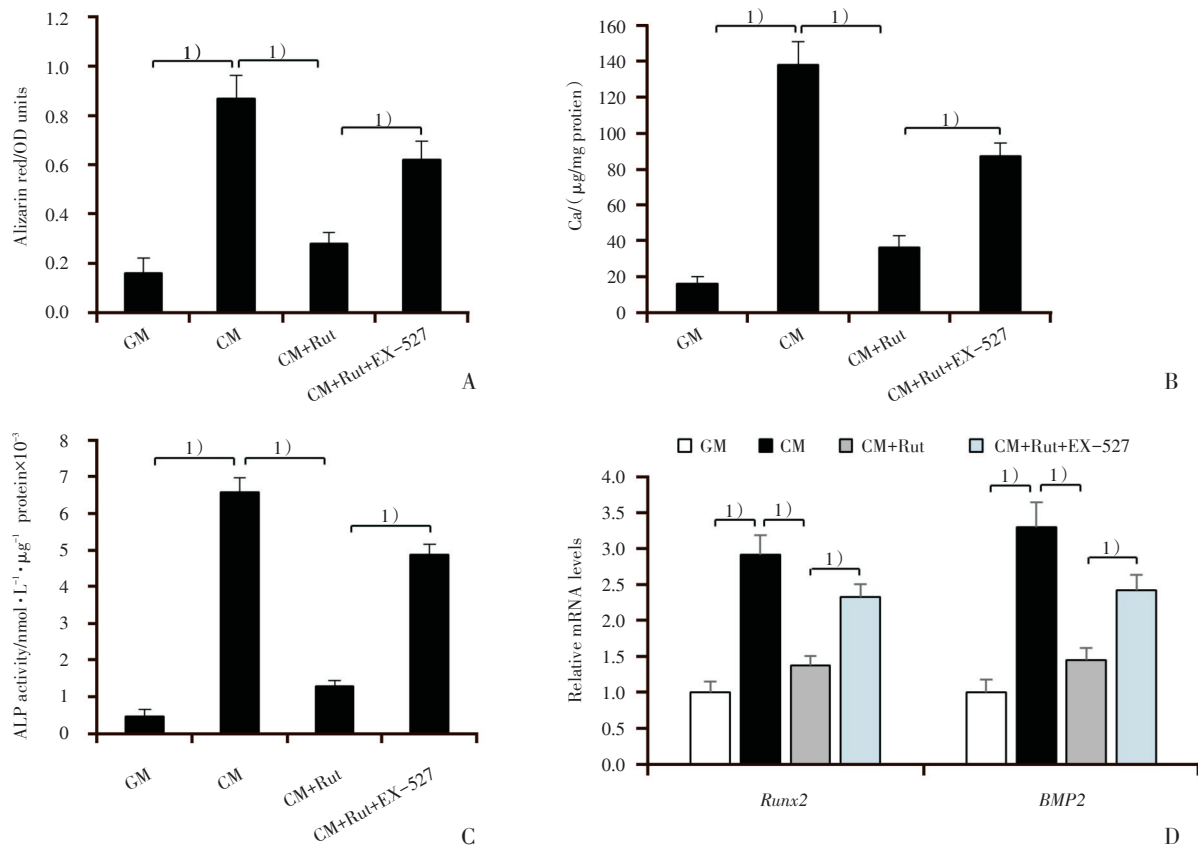
为研究 Sirt1 是否介导了 Rut 抑制 VSMC 钙化的作用,我们采用 Sirt1 抑制剂 EX-527 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞,观察其对 Rut 抑制 VSMC 钙化的影响。结果发现: Sirt1 抑制剂 EX-527 能明显阻断 Rut 抑制 VSMC 钙化的作用(图 4A、B;  $138 \pm 13$ 、 $36 \pm 7$ 、 $87 \pm 8$ ,  $P < 0.05$ ), 升高 ALP 的活性(图 4C,  $P < 0.05$ ), 和上调 *Runx2* 和 *BMP2* mRNA 的表达水平(图 4D;  $P < 0.05$ )。这些结果均提示 Sirt1 参与了 Rut 抑制 VSMC 钙化的过程。

## 3 讨论

血管钙化是一种与骨生成类似,受基因调控的生物学过程,其形成机制十分复杂,目前临床上尚缺乏有效的干预方法。本研究发现 Rut 能剂量

依赖性地抑制大鼠 VSMC 成骨样分化和钙化。另外,我们发现 Rut 能上调钙化抑制因子 Sirt1 的表达,抑制 Sirt1 后可阻断 Rut 对 VSMC 成骨样分化和钙化的抑制作用,说明 Sirt1 参与了 Rut 抑制 VSMC 成骨样分化和钙化的过程。

大量研究表明钙磷代谢紊乱是导致血管钙化的危险因素,高磷高钙能促进血管平滑肌细胞钙化,血管平滑肌细胞出现成骨样分化,骨相关蛋白包括 *Runx2*、*BMP2*、*Osterix* 和 ALP 等表达上调<sup>[11-13]</sup>。本研究也发现:高磷高钙能明显诱导 VSMC 钙化,上调血管平滑肌细胞 *Runx2*、*BMP2* 和 *Osterix* mRNA 的表达水平和提高 ALP 的活性。Rut 是从中药吴茱萸中提取的重要生物活性碱,具有抑制血管平滑肌增殖和动脉粥样硬化的功能<sup>[7,14]</sup>。在此基础上,本研究观察了 Rut 对血管平滑肌细胞成骨样表型转化和钙化的作用。我们的研究发现:Rut 能明显地抑制血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化。



Rat VSMC were treated with Sirt1 inhibitor EX-527 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) together with Rut (5  $\mu\text{mol/L}$ ) for 8 days. A: Alizarin red dye was quantified by a microplate reader. B: Calcium content was measured. C: ALP activity was determined by a microplate reader. D: *Runx2* and *BMP2* mRNA expression was measured by qRT-PCR. 1)  $P < 0.05$ .  $n = 3$

图4 抑制 Sirt1 对吴茱萸次碱抗平滑肌细胞钙化的影响

Fig.4 Effect of Sirt1 inhibition by EX-527 on the role of Rut in VSMC calcification

既往的研究证明:Sirt1可抑制血管平滑肌细胞成骨样分化和血管钙化,高磷刺激血管平滑肌细胞可抑制Sirt1的表达,下调Sirt1可促进血管平滑肌细胞钙化<sup>[8]</sup>。本研究也发现高磷高钙可明显下调Sirt1的表达水平。另外,我们的研究发现Rut可上调Sirt1的表达水平。使用Sirt1抑制后可阻断Rut抑制血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化的作用,说明Rut可通过上调Sirt1的表达水平

发挥其抑制血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化的作用。

综上所述,本研究发现:高磷高钙可刺激血管平滑肌细胞下调Sirt1的表达水平,促进血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化。Rut可通过上调Sirt1的表达,从而抑制血管平滑肌细胞钙化。本研究为血管钙化的防治提供了新的线索,将来的动物实验可望进一步阐明Rut对血管钙化的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] Gourgas O, Marulanda J, Zhang P, et al. Multidisciplinary approach to understand medial arterial calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(2):363-372.
- [2] Tsao CW, Pencina KM, Massaro JM, et al. Cross-sectional relations of arterial stiffness, pressure pulsatility, wave reflection, and arterial calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(11):2495-2500.
- [3] Hermann DM, Gronewold J, Lehmann N, et al. Coronary artery calcification is an independent stroke predictor in the general population[J]. *Stroke*, 2013, 44(4):1008-1013.
- [4] Kong Y, Liang Q, Chen Y, et al. Hyaluronan negatively regulates vascular calcification involving BMP2 signaling [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(10):1320-1332.
- [5] Kwon DH, Eom GH, Ko JH, et al. MDM2 E3 ligase-mediated ubiquitination and degradation of HDAC1 in vascular calcification [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10492.
- [6] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease [J]. *Circulation*, 2008, 117(22):2938-2948.
- [7] Li YJ, Zhang F, Gong QH, et al. Rutaecarpine inhibits angiotensin II-induced proliferation in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(9):682-687.
- [8] Takemura A, Iijima K, Ota H, et al. Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(9):2054-2062.
- [9] 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):151-160.
- [10] Song Y, Hou M, Li Z, et al. TLR4/NF- $\kappa$ B/Ceramide signaling contributes to Ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 794:45-51.
- [11] Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, et al. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate [J]. *Circ Res*, 2011, 109(6):697-711.
- [12] Liu L, Liu Y, Zhang Y, et al. High phosphate-induced downregulation of PPAR $\gamma$  contributes to CKD-associated vascular calcification [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 114:264-275.
- [13] Yamada S, Leaf EM, Chia JJ, et al. PiT-2, a type III sodium-dependent phosphate transporter, protects against vascular calcification in mice with chronic kidney disease fed a high-phosphate diet [J]. *Kidney Int*, 2018, 94(4):716-727.
- [14] Xu Y, Liu Q, Xu Y, et al. Rutaecarpine suppresses atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  mice through upregulating ABCA1 and SR-BI within RCT [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(8):1634-1647.

(编辑 孙慧兰)