

雌激素对去卵巢大鼠血管钙化的影响

吴新华 刘权仪 刘宏 陈章荣 杨伟 赵秋燕 李文彬

【摘要】 目的:探讨雌激素对去卵巢大鼠血管钙化的影响。 方法:将40只雌性SD大鼠随机分为5组,每组8只。空白对照组正常喂养。去卵巢钙化组、 β_2 雌二醇(E_2)溶媒对照组和 E_2 干预组均切除双侧卵巢,假手术钙化组切除卵巢周围等体积的脂肪组织,术后给予维生素 D_3 30万 $U \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 注射3d建立血管钙化模型。 E_2 溶媒对照组和 E_2 干预组分别给予玉米油(溶媒)、 E_2 50 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 腹腔注射28d。腹主动脉采血,检测大鼠血清钙离子、 E_2 浓度;分离主动脉,Von kossa染色检测血管钙化情况,实时聚合酶链反应、Western blot检测成骨细胞Runt相关转录因子2(Runx2)的mRNA、蛋白表达水平。 结果:去卵巢、血管钙化大鼠(假手术钙化组、去卵巢钙化组、 E_2 溶媒对照组、 E_2 干预组) E_2 水平较空白对照组明显下降(P 均 <0.01), E_2 干预组血清 E_2 水平较 E_2 溶媒对照组明显升高($P<0.01$)。Von Kossa染色示去卵巢、血管钙化大鼠有不同程度黑色颗粒沉积于血管弹力层间,弹力层迂曲、断裂,甚至可见血管中层大范围撕裂, E_2 干预组血管黑色颗粒沉积有所减少,血管钙化程度较 E_2 溶媒对照组明显减轻($P<0.05$)。实时聚合酶链反应、Western blot结果显示去卵巢、血管钙化大鼠Runx2的mRNA、蛋白表达水平较空白对照组明显增加(P 均 <0.05), E_2 干预组Runx2的mRNA及蛋白表达水平较 E_2 溶媒对照组明显降低($P<0.05$)。 结论: E_2 可能通过降低Runx2的表达抑制血管钙化。

【关键词】 雌激素;血管钙化;Runt相关转录因子2

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.01.010

Effect of estrogen on vascular calcification in ovariectomized rats WU Xinhua¹, Liu Quanyi², LIU Hong¹, CHEN Zhangrong¹, YANG Wei³, ZHAO Qiuyan¹, LI Wenbin⁴. 1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000; 2. Department of Cardiology, Huizhou Third People's Hospital, Huizhou 516000; 3. Department of Cardiology, Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000; 4. Cadre's Sanitarium, Military Region in Yunnan Province Dali Zones, Dali 671000, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of estrogen on vascular calcification in rats.

Methods: Forty female SD rats were randomly divided into 5 groups with 8 rats in each group. The blank control group was given normal feeding. Except of the mice in the sham operated calcification group (the same volume of adipose tissue around the ovary was removed), mice underwent bilateral ovaries resection in the ovariectomized and calcification group, the β -estradiol (E_2) solvent control group and the E_2 intervention group. After operation, the vascular calcification model was established by injecting vitamin D_3 300 000 $U \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ for 3 days. E_2 solvent control group and E_2 intervention group were given corn oil (solvent) or E_2 50 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ intraperitoneal injection for 28 days, separately. Blood samples were collected from abdominal aorta to detect serum calcium concentration and E_2 concentration. Von Kossa staining was used to detect vascular calcification in isolated aorta; real-time

基金项目:国家自然科学基金(81560073)

作者单位:671000 大理大学第一附属医院心血管内科(吴新华,刘宏,陈章荣,赵秋燕);516000 惠州第三人民医院心血管内科(刘权仪);453000 新乡医学院第三附属医院心血管内科(杨伟);671000 中国人民解放军云南大理军分区干休所(李文彬)

通信作者:刘宏,E-mail: daliluhong@163.com

PCR and Western blot were used to detect the expression of mRNA and protein of runt-related transcription factor 2 (Runx2). **Results:** The level of serum E_2 in sham operated calcification group, ovariectomized calcification group, E_2 solvent control group and E_2 intervention group was significantly lower than that of blank control group (all $P < 0.01$), and serum E_2 level in E_2 intervention group was higher than that in E_2 solvent control group ($P < 0.01$). Von Kossa staining showed that in ovariectomized and vascular calcified rats, there were black particles deposited in different degree in the elastic layer of blood vessels, and the elastic layer was tortuous and broken, and even a large range of tears could be seen in media. The deposition of black particles and degree of vascular calcification in E_2 intervention group were significantly lower than that in E_2 solvent control group (both $P < 0.05$). The results of real-time PCR and western blot showed that the mRNA and protein expression levels of Runx2 in ovariectomized and vascular calcified rats were significantly lower than those in the blank control group (all $P < 0.05$), and the mRNA and protein expression levels of Runx2 in E_2 intervention group were significantly lower than those in E_2 solvent control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** E_2 may inhibit vascular calcification by decreasing the expression of Runx2.

【Key words】 Estrogen; Vascular calcification; Runt-related transcription factor 2

冠状动脉钙化(CAC)是冠状动脉粥样硬化的标志。研究表明,CAC积分与动脉粥样硬化斑块负荷有关,可预测心血管事件^[1-2]。CAC与性别明显相关,未绝经妇女的CAC程度及发病率明显低于同龄男性^[3-4]。CAC积分是绝经后女性心血管不良事件的独立预测因素^[5]。动物去卵巢可以加重血管钙化程度^[6],体外实验也证实雌激素与血管钙化密切相关^[7]。

血管钙化过程类似骨形成过程,骨转录因子参与调节该过程。成骨细胞 Runt 相关转录因子 2 (Runx2)是转录因子 Runxx 家族成员之一,在血管钙化过程中起重要作用^[8]。 β 雌二醇(E_2)可通过拮抗成骨细胞中的 Runx2 调节骨转换过程^[9]。本研究探讨 E_2 是否可能通过调节 Runx2 的表达影响血管钙化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级雌性 SD 大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量(220 ± 10)g,大鼠饲养按照《大理大学实验动物饲养管理办法》执行。 E_2 、维生素 D_3 和钙含量测定试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司,抗-Runx2 抗体购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记二抗购自中国 Proteintech 公司,Von Kossa 染色试剂盒购自中国 Solarbio 公司, E_2 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自中国 BlueGene 公司。

1.2 动物实验分组

40 只雌性 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术钙化组、去卵巢钙化组、 E_2 溶媒对照组、 E_2 干预组,每组 8 只。空白对照组给予正常喂养。去卵巢钙化组、 E_2 溶媒对照组和 E_2 干预组均切除双侧卵

巢,假手术钙化组切除卵巢周围等体积的脂肪组织,所有手术大鼠术后给予青霉素 80 万 U/d,共 3 d。除空白对照组,其他组均于术后 3 周后给予维生素 D_3 30 万 $U \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 腹腔注射 3 d 诱导血管钙化。诱导钙化后, E_2 干预组给予 E_2 50 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 腹腔注射 28 d, E_2 溶媒对照组腹腔注射等体积玉米油(溶媒)28 d。28 d 后,使用 10% 的水合氯醛麻醉大鼠(0.3 mL/100 g),腹主动脉取血后处死大鼠,分离胸、腹主动脉,分段留取标本。

1.3 血管组织 Von Kossa 染色

将大鼠胸、腹主动脉置于 10% 中性福尔马林溶液固定 12 h 后,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片,切片厚度 5 μm ,70 $^{\circ}C$ 恒温烘箱中烤片 2 h,脱蜡至水,滴加 Von Kossa 试剂盒中硝酸银溶液 50 μL ,紫外照射 30 min,流水冲洗切片 1 min 后入海波溶液洗脱 2 min,复染细胞核,中性树胶封片。显微镜下观察,利用 ImageJ 2.0 软件测量血管钙化面积。

1.4 血清钙离子水平检测

将大鼠主动脉血 2 500 转/min 离心 3 min,取上清液,送大理大学第一附属医院检验科测定血清钙离子水平。

1.5 ELISA 检测血清 E_2 水平

将大鼠主动脉血 2 500 转/min 离心 3 min,取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,用酶标仪在 450 nm 处测量各组 OD 值。根据标准品的浓度和 OD 值计算出样品浓度。

1.6 实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测 Runx2 的 mRNA 表达水平

Trizol 法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板加入上下游引物,应用 StepOne

Real-Time PCR 仪进行 PCR 反应。Runx2 引物序列:上游 5'-CCTCGAATGGCAGGACGCTA-3',下游 5'-AGACTCATCCATTCTGCCGCTA-3'。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, β -actin 引物序列为:上游 5'-TGTGCTGGACTCTGGAGATG-3',下游 5'-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3'。反应条件为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,54.5 °C 退火 1 min,共循环 40 次。重复 3 次,目的基因的 mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.7 Western blot 法检测 Runx2 的蛋白表达水平

用蛋白裂解液(RIPA)提取蛋白,BCA 法测量蛋白浓度。采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶封闭,4 °C 过夜。Runx2 一抗 4 °C 孵育 8 h,二抗 4 °C 孵育 2 h,洗膜后加入化学发光试剂,在化学发光成像系统(MiniChemi K4)上显像,应用 ImageJ 对图像进行分析,计算目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

所有数据采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析,正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 E₂、血清钙离子水平比较

与空白对照组及假手术钙化组相比,所有去卵巢组(去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组及 E₂ 干预组)E₂ 水平均明显下降(P 均 < 0.01),E₂ 干预组在补充雌激素后血清 E₂ 水平较 E₂ 溶媒对照组及去卵

巢钙化组均升高(P 均 < 0.01)。假手术钙化组、去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组、E₂ 干预组在应用大剂量维生素 D₃ 后,大鼠血清钙离子水平均有上升趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 E₂ 与血清钙离子水平比较($n=8$)

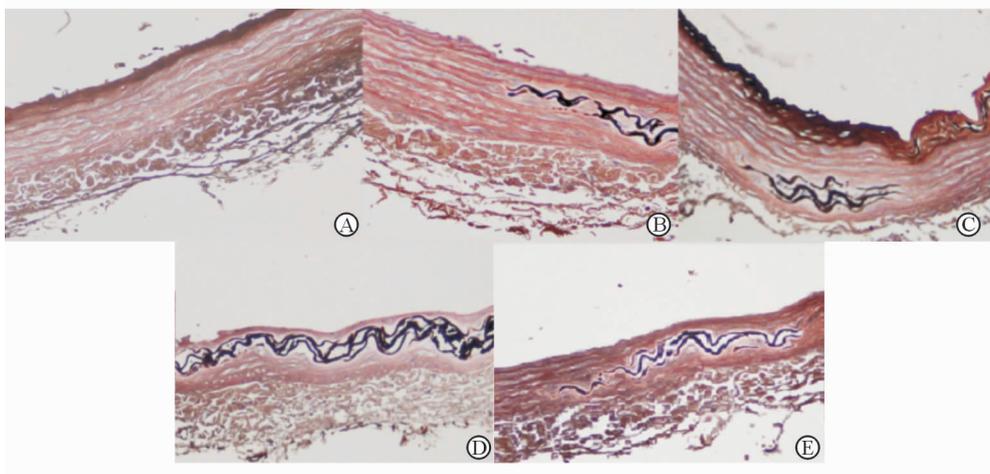
分组	E ₂ /pg · mL ⁻¹	钙离子/mmol · L ⁻¹
空白对照组	3 123.50 \pm 610.02	2.37 \pm 0.32
假手术钙化组	2 614.00 \pm 237.45	2.67 \pm 0.29
去卵巢钙化组	844.75 \pm 338.00 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.70 \pm 0.26
E ₂ 溶媒对照组	688.00 \pm 244.63 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.54 \pm 0.39
E ₂ 干预组	1 730.75 \pm 310.50 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	2.46 \pm 0.19

注:与空白对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$;与假手术钙化组比较,⁽²⁾ $P < 0.01$;与去卵巢钙化组比较,⁽³⁾ $P < 0.01$;与 E₂ 溶媒对照组比较,⁽⁴⁾ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血管钙化的组织学比较

空白对照组血管组织 Von Kossa 染色可见弹力层规则,无卷曲、断裂等,未着色;假手术钙化组、去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组应用大剂量维生素 D₃ 后,可见不同程度黑色颗粒沉积于血管弹力层间,弹力层迂曲、断裂,甚至可见血管中层大范围撕裂。E₂ 干预组采用雌激素干预,血管黑色颗粒沉积有所减少。见图 1。

通过 VonKossa 染色对血管钙化面积进行分析,发现去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组较假手术钙化组钙化面积明显增多(46.85% \pm 9.13%、54.26% \pm 8.65% 对 23.17% \pm 6.22%),E₂ 干预组(35.11% \pm 7.27%) 在雌激素干预后血管钙化程度较去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组明显减轻(P 均 < 0.05)。



注:A 为空白对照组;B 为假手术钙化组;C 为去卵巢钙化组;D 为 E₂ 溶媒对照组;E 为 E₂ 干预组

图 1 大鼠血管组织 Von Kossa 染色结果(200 \times)

2.3 各组大鼠主动脉 Runx2 的 mRNA 和蛋白表达水平比较

Real-time PCR 和 Western blot 结果显示,与空白对照组相比,假手术钙化组、去卵巢钙化组、E₂ 溶媒对照组 Runx2 的 mRNA、蛋白表达水平均有不同程度增加;E₂ 干预组在雌激素干预后 Runx2 的 mRNA 及蛋白表达水平较去卵巢钙化组及 E₂ 溶媒对照组均显著降低($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

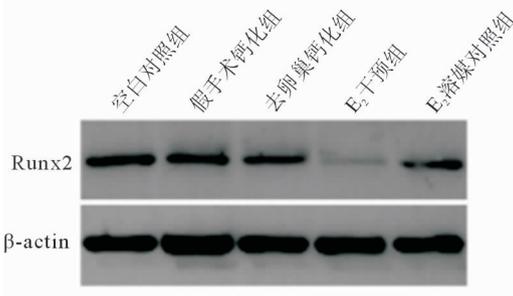


图 2 各组大鼠主动脉组织中 Runx2 蛋白表达水平

表 2 各组大鼠主动脉组织 Runx2 mRNA 及蛋白表达水平比较($n=3$)

分组	mRNA 相对表达水平	蛋白相对表达水平
空白对照组	1.00 ± 0.06	0.37 ± 0.04
假手术钙化组	3.46 ± 1.51 ⁽¹⁾	0.59 ± 0.12 ⁽²⁾
去卵巢钙化组	5.75 ± 0.50 ⁽¹⁾	0.55 ± 0.07 ⁽¹⁾
E ₂ 溶媒对照组	5.43 ± 0.66 ⁽¹⁾	0.44 ± 0.11 ⁽¹⁾
E ₂ 干预组	1.28 ± 0.24 ⁽³⁾⁽⁴⁾	0.17 ± 0.03 ⁽³⁾⁽⁴⁾

注:与空白对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与空白对照组比较,⁽²⁾ $P < 0.001$;与去卵巢钙化组比较,⁽³⁾ $P < 0.05$;与 E₂ 溶媒对照组比较,⁽⁴⁾ $P < 0.05$

3 讨论

本研究以大剂量维生素 D₃ 诱导大鼠血管钙化形成,E₂ 干预可以抑制血管钙化,降低血管组织中成骨转录因子 Runx2 的 mRNA 和蛋白表达水平,提示雌激素可能通过抑制 Runx2 的表达减轻血管钙化。

Price 等^[10] 研究发现,大剂量维生素 D₃ (50 万 U/kg,共 3 d) 可以引起广泛的异位钙化,96 h 后血清钙升高约 34%。本研究采用维生素 D₃ 干预大鼠,成功建立血管钙化模型,但大鼠血清钙离子水平未见明显变化,可能是由于检测时间晚,大鼠机体自稳调节能力增强,维生素 D₃ 所引起的血清钙升高已经回落。

Choi 等^[6] 研究发现,去卵巢后血管钙化明显加

重。在血管钙化发生初期,血管平滑肌细胞(VSMC)发生成骨样细胞转化,表达多种成骨因子,分泌基质囊泡,诱导钙盐沉积,甚至矿化结构也与骨组织非常相似^[11]。Nanao-Hamai 等^[12] 应用无机磷诱导 VSMC 钙化,E₂ 通过抑制生长停滞特异性基因产物 6(Gas6) 的表达抑制 VSMC 钙化。在本研究的血管钙化模型中,大鼠主动脉广泛钙化,血管组织 Von Kossa 染色显示黑色钙盐颗粒沉积于血管中膜,弹力层紊乱、甚至断裂,去卵巢后血管钙化程度加重,而正常对照组血管中膜弹力层结构规则,呈波浪状,未见钙盐沉积。说明维生素 D₃ 可引起血管钙化,与 Price 等^[10] 的研究结果相似。

Runx2 是一种关键的成骨转录因子,在钙化的粥样硬化斑块中表达^[13],是软骨细胞成熟、软骨细胞表型分化、血管侵入软骨及破骨细胞生成的必需蛋白^[14],在血管钙化过程中起重要作用。本研究中用 E₂ 干预大鼠血管钙化,可见 Runx2 表达减少,说明 Runx2 可能是雌激素抑制钙化的下游靶点。

综上所述,本研究证实 E₂ 可以降低 Runx2 的表达,影响血管钙化进程。但 E₂ 对心血管系统的保护作用机制涉及多通路、多靶点,完整的作用机制仍需进一步深入研究。本研究明确了 E₂ 在血管钙化中所发挥的保护作用及分子生物学机制,对有效预防心血管疾病的发生、治疗心血管疾病提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Kronmal RA, McClelland RL, Detrano R, et al. Risk factors for the progression of coronary artery calcification in asymptomatic subjects: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)[J]. Circulation, 2007, 115(21): 2722-2730.
- [2] Erbel R, Möhlenkamp S, Moebus S, et al. Coronary risk stratification, discrimination, and reclassification improvement based on quantification of subclinical coronary atherosclerosis: the Heinz Nixdorf Recall study[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(17):1397-1406.
- [3] Rosano GM, Vitale C, Marazzi G, et al. Menopause and cardiovascular disease: the evidence [J]. Climacteric, 2007, 10(Suppl 1):19-24.
- [4] Wake R, Yoshiyama M. Gender differences in ischemic heart disease[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2009, 4(3): 234-240.
- [5] Christian RC, Liu PY, Harrington S, et al. Intimal estrogen receptor (ER)beta, but not ERalpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre- and postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91

(7);2713-2720.

[6] Choi BG, Vilahur G, Cardoso L, et al. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway[J]. Eur J Clin Invest, 2008, 38(4): 211-217.

[7] Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system; common mechanism of osteoporosis and vascular calcification [J]. Circ Res, 2010, 107(4):466-475.

[8] 吴新华, 陈章荣, 刘宏. 冠状动脉钙化基础与临床[M]. 北京:科学出版社, 2019.

[9] Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(7):862-871.

[10] Price PA, June HH, Buckley JR, et al. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(10):1610-1616.

[11] Byon CH, Javed A, Dai Q, et al. Oxidative stress induces

vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling[J]. J Biol Chem, 2008, 283(22):15319-15327.

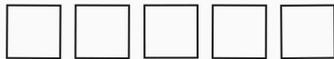
[12] Nanao-Hamai M, Son BK, Hashizume T, et al. Protective effects of estrogen against vascular calcification via estrogen receptor α -dependent growth arrest-specific gene 6 transactivation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(3):429-435.

[13] Tyson KL, Reynolds JL, Mcnair R, et al. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(3):489-494.

[14] Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development[J]. J Cell Biochem, 2002, 87(1):1-8.

(收稿:2020-03-01 修回:2020-11-30)

(本文编辑:胡晓静)



欢迎关注《国际心血管病杂志》公众号!