

长春西汀对小鼠血管平滑肌细胞成骨样分化的影响*

马允允^{1▲} 梁秋华² 张正军² 孟强² 李懂² 孙琳^{2△}

(¹ 济宁医学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 **目的** 初步探讨长春西汀对小鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)成骨样分化的影响。**方法** 使用 10mMβ-甘油磷酸钠(beta-glycerophosphate, β-GP)诱导小鼠原代 VSMCs 向成骨样分化, 以 10μM 长春西汀干预 β-GP 诱导的小鼠 VSMCs, 应用 Western blotting 分析法检测 Runt 相关转录因子 2(Run related transcription factor 2, Runx2), 骨形成蛋白-2(bone morphology protein-2, BMP-2) 以及核转录因子-Kappa B(nuclear factor kappaB, NF-κB) p65 的表达, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒检测 ALP 活性, 茜素红染色观察矿化结节形成的情况。**结果** 1) β-GP 可显著增强 ALP 的活性, 增加 Runx2 和 BMP-2 的表达, 并促进矿化结节的形成; 2) 长春西汀可显著减弱 ALP 活性, 抑制 Runx2 和 BMP-2 的表达, 减少矿化结节的形成; 3) 长春西汀抑制 NF-κB 活化。**结论** 长春西汀可通过 NF-κB 信号通路显著抑制小鼠 VSMCs 成骨样分化。

关键词 动脉钙化; 血管平滑肌细胞; 成骨样分化; 长春西汀

中图分类号: R589.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2016)04-082-05

Effect of vinpocetine on the osteoblastic differentiation of mouse vascular smooth muscle cells

MA Yunyun¹, LIANG Qiuhua², ZHANG Zhengjun², MENG Qiang², LI Dong², SUN Lin²

(¹ Jining Medical University, Jining 272067; ² The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of vinpocetine on the osteoblastic differentiation of mouse vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** 10mM of beta-glycerophosphate (β-GP) was used to induce osteoblastic differentiation of mouse VSMCs. 10μM of vinpocetine was treated on the β-GP-stimulated VSMCs. The protein expression of Run related transcription factor 2 (Runx2), bone morphology protein-2 (BMP-2) and nuclear factor kappaB (NF-κB) p65 subunit were determined by Western Blot. Alkaline phosphatase (ALP) assay kit was used to determine the ALP activity. The formation of mineralized nodules was determined by Alizarin Red S staining. **Results** 1) β-GP significantly increased ALP activity and the expression of Runx2 and BMP-2 which promoted the formation of mineralized nodules. 2) Vinpocetine significantly decreased ALP activity and the expression of Runx2 and BMP-2, which attenuated the formation of mineralized nodule. 3) Vinpocetine significantly inhibited the translocation of NF-κB p65 into the nucleus. **Conclusion** Vinpocetine may exert its inhibitory effect on osteoblastic differentiation of VSMCs via NF-κB signaling pathway.

Keywords: Vascular calcification; Vascular smooth muscle cells; Osteoblastic differentiation; Vinpocetine

动脉钙化常见于老年人、糖尿病以及终末期肾病患者^[1], 是急性心肌梗死、脑梗死和截肢的独立危险因素。动脉钙化可由高磷血症、高钙血症、尿毒症、1α, 25-二羟维生素 D、华法令和焦磷酸盐缺

乏等多种因子诱导发生^[2]。目前研究表明动脉钙化是一种类似于骨形成的主动调节过程^[3], 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)成骨样分化是其关键性的环节^[4], 此过程包括成骨样特异性表型基因的表达和矿化结节形成。然而其具体的发病机制和有效的治疗措施仍不明确。长春西汀是从长春花中提取的一种吲哚类生

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81400860)

▲ 马允允, 济宁医学院 2013 级研究生

△ [通信作者] 孙琳, E-mail: sunlinsddx@sina.com

物碱,已被广泛应用于缺血性脑血管疾病的治疗。以往研究发现长春西汀可通过抑制磷酸二酯酶活性而舒张血管平滑肌,增加脑部血液的供应^[5];通过阻滞 Na⁺通道和抑制氧自由基生成,改善脑部血液循环和脑代谢,从而达到保护神经细胞的作用^[6]。最近研究发现长春西汀通过阻止核转录因子-kappaB(nuclear factor kappaB, NF-κB)活化来抑制炎症反应,通过抑制活性氧活化来影响细胞生长^[7-8]。然而,目前尚无研究表明长春西汀对于 VSMCs 成骨样分化有影响。本文应用 β-甘油磷酸钠(beta-glycerophosphate, β-GP)诱导小鼠 VSMCs 成骨样分化,探讨长春西汀对小鼠 VSMCs 成骨样分化的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

长春西汀注射液购于中国河南润弘制药公司,DMEM 培养液、胎牛血清(FBS)均购于美国 Gibco 公司,β-GP 购于加拿大 Fermentas 公司,茜素红购于美国 Sigma 公司,0.25% 胰酶 + EDTA 购于美国 Sigma 公司,兔抗小鼠 Runx2 相关转录因子 2(Runx2 related transcription factor 2, Runx2)、骨形成蛋白-2(bone morphology protein-2, BMP-2)、NF-κB p65、β-actin 以及山羊抗兔二抗购于北京博奥森生物技术有限公司,碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)试剂盒购于南京建成生物工程研究所,胞浆及核蛋白提取试剂盒购于江苏碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动脉钙化细胞模型的建立 小鼠原代 VSMCs(购于江阴齐氏生物科技有限公司)在 DMEM 完全培养基中培养(含 4.5g/L 的葡萄糖、10mM 的丙酮酸钠、10% FBS、100U/ml 的青霉素和 100μg/ml 的链霉素)。按照以往的研究应用 10mM β-GP 刺激 VSMCs 建立动脉钙化的细胞模型^[9]。

1.2.2 Western Blotting 检测 Runx2、BMP-2 和 NF-κB 的表达 将细胞接种在六孔板中,分空白对照组、钙化组、干预组。空白对照组给予 DMEM 完全培养基培养,钙化组给予 10mM β-GP 诱导,干预组在钙化组基础上给予 10 μM 长春西汀干预。刺激 7d 后使用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取胞浆蛋白和核蛋白,行 Western Blotting 检测胞浆蛋白中 Runx2、BMP-2 的表达以及核蛋白中 NF-κB p65 的表达。流程如下:取 10μg 蛋白,经 10% SDS-PAGE 分离,转印到 0.2 μm PVDF 膜上;室温

下在 5% 脱脂奶粉中封闭 1h,用 TBS-T(含 0.1% 吐温-20)洗涤 3 次,加入按说明书要求稀释适当浓度(1:1000)的兔抗小鼠一抗,4℃ 孵育过夜;TBS-T 洗涤 3 次,加入 1:10000 稀释的山羊抗兔二抗,室温摇床孵育 1h,TBS-T 洗涤 2 次,TBS 洗涤 2 次,加入 ECL 化学发光液(A 液:B 液 = 1:1),胶片曝光适当时间后显影、定影,观察结果。

1.2.3 ALP 活性检测 VSMCs 在六孔板中使用 DMEM 完全培养基培养,分组同前,孵育 7d。干预结束后弃去培养液,用 PBS 冲洗 3 遍,每孔加入 200μl 细胞裂解液(江苏碧云天生物技术有限公司,含 1mM PMSF + 1mM 磷酸二酯酶抑制剂)裂解细胞,4℃ 下 12000g 离心后取上清。按照试剂盒说明书操作:加入缓冲液,37℃ 孵育 30min,NaOH 终止反应,测定 405nm 的吸收值。ALP 活性用 p2 硝基苯酚为标准值计算,1 单位表示 30min 内产生 1nM 硝基苯酚的活性。

1.2.4 茜素红染色 将 VSMCs 接种于 24 孔板中,使用含 DMEM 完全培养基培养,分组同前给予连续培养 14d。干预结束后 PBS 洗涤 3 遍,使用 95% 酒精常温下固定 10min。再次用 PBS 洗涤 3 遍,加入 1% 茜素红溶液,37℃ 温箱内染色 1h,PBS 洗涤 3 次,显微镜下观察矿化结节染色情况。

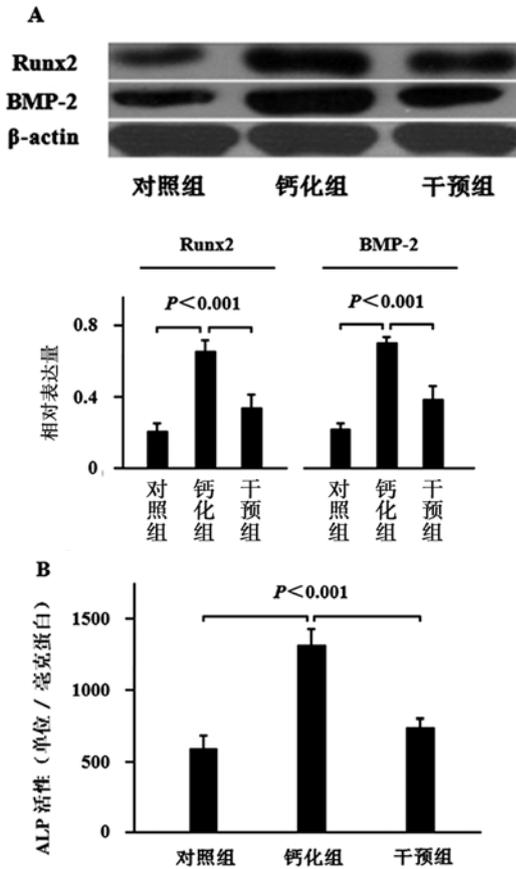
1.3 统计学方法

所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS20.0 统计软件进行统计处理,多个样本间均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数的两两比较采用 Dunnett 法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 长春西汀显著抑制 β-GP 刺激下 VSMCs 的 Runx2 和 BMP-2 表达和 ALP 活性

使用 10mM β-GP 刺激小鼠 VSMCs 7d,使用 Western Blotting 法检测 Runx2 和 BMP-2 的表达,ALP 试剂盒检测 ALP 活性。结果显示,与空白对照组相比,钙化组中 Runx2 和 BMP-2 的表达显著增加($t_{Runx2} = 14.8, P < 0.001; t_{BMP-2} = 8.73, P < 0.001$),ALP 活性也显著增强($P < 0.001$)。在 β-GP 刺激的基础上,加用 10μM 长春西汀干预结果显示长春西汀可显著减少 VSMCs 中 Runx2 和 BMP-2 的表达($t_{Runx2} = 8.86, P < 0.001; t_{BMP-2} = 8.64, P < 0.001$),与钙化组相比,ALP 的活性也显著被抑制($P < 0.001$)。见图 1、表 1。



A: 长春西汀对 β-GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 Runx2、BMP-2 表达的影响
B: 长春西汀对 β-GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 ALP 活性的影响

图 1 长春西汀对 β-GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 Runx2 和 BMP-2 表达以及 ALP 活性的影响

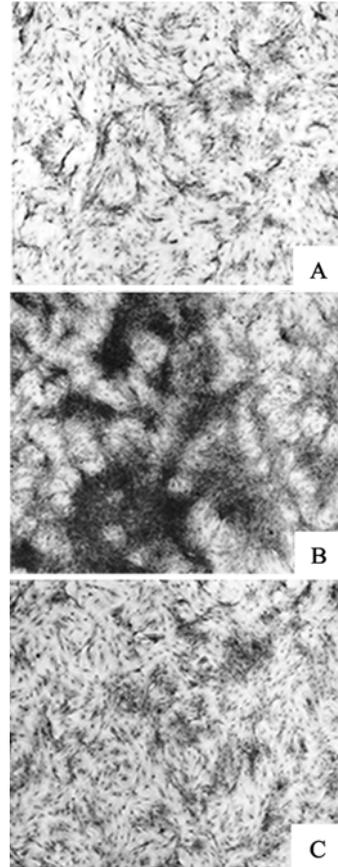
表 1 长春西汀对 β-GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 Runx2 和 BMP-2 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Runx2	BMP-2
对照组	0.190 ± 0.023	0.209 ± 0.020
钙化组	0.652 ± 0.049 *	0.657 ± 0.049 *
干预组	0.338 ± 0.037 **	0.372 ± 0.030 **

注: 与对照组相比, * $P < 0.001$; 与钙化组相比, ** $P < 0.001$

2.2 长春西汀减少小鼠 VSMCs 矿化结节的形成

小鼠 VSMCs 在多种因素影响下可分化为成骨细胞, 形成与成骨过程中相似的基质小泡, 由钙离子聚集, 形成钙化中心, 从而形成矿化结节^[4,10-11]。分组同前的, 干预 14d 后茜素红染色, 结果如图 2 所示, 与空白对照组相比, 钙化组有典型的矿化结节形成, 与钙化组相比, 干预组矿化结节的形成显著减少。



A. 对照组 B. 钙化组 C. 干预组

图 2 长春西汀对小鼠 VSMCs 矿化结节形成的影响

2.3 长春西汀通过 NF-κB 信号通路抑制 VSMCs 成骨样分化

如图 3、表 2 所示, 与对照组比较, 钙化组 NF-κB p65 的表达增加 ($t = 13.89, P < 0.001$); 与钙化组比较, 长春西汀干预组可显著减少 NF-κB p65 在 VSMCs 核内的表达 ($t = 10.03, P < 0.001$)。详见图 3、表 2。

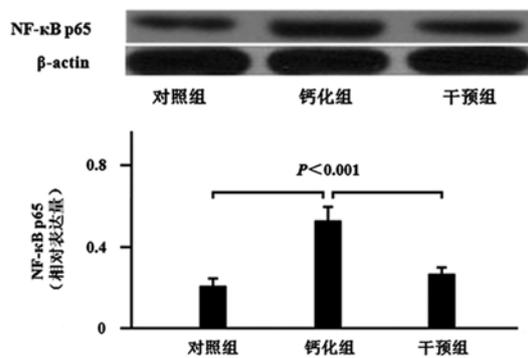


图 3 长春西汀对 β-GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 NF-κB p65 蛋白相对表达量的影响

表 2 长春西汀对 β -GP 刺激后小鼠 VSMCs 的 NF- κ B p65 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	NF- κ B p65
对照组	0.219 \pm 0.026
钙化组	0.562 \pm 0.034 *
干预组	0.275 \pm 0.036 **

注:与对照组相比, * $P < 0.001$;与钙化组相比, ** $P < 0.001$

3 讨论

动脉钙化是预测糖尿病、终末期肾病患者心血管事件发生的重要因子。既往认为动脉钙化是被动的钙盐沉积过程,随着不断深入的研究发现动脉钙化是类似于骨形成的主动调节过程,其中 VSMCs 向成骨样分化是其细胞学病理基础。在动脉钙化的过程中,一些骨形成相关因子,如 ALP、Runx2、BMP-2 等可在钙化区域检测到^[12]。

在本实验中,我们应用 β -GP 诱导 VSMCs 成骨样分化,建立经典的动脉钙化细胞模型。既往研究表明骨形成相关因子 ALP、Runx2、BMP-2 在 VSMCs 成骨样分化的过程中的表达是增加的^[9,13]。ALP 是成骨细胞分化的表型标记物之一,在 VSMCs 向成骨样分化的早期即可观察到 ALP 活性的增强。在我们的研究中应用 10mM β -GP 诱导 7d 后,检测到小鼠 VSMCs 中 ALP 活性较对照组显著增强,这与 Li 等发现在 β -GP 干预 10d 后,大鼠 VSMCs 中 ALP 的活性显著增强^[14]的结果相一致。Runx2 又称为核转录因子 $\alpha 1$ (cbf $\alpha 1$),属于 Runt 结构域基因家族,对成骨细胞发育很关键,是成骨细胞分化和骨形成的重要转录因子。Shan 等报道在 β -GP 诱导小鼠 VSMCs 的过程中 Runx2 的表达是增加的^[13],在本实验中我们应用 10mM β -GP 诱导小鼠 VSMCs 7d 后检测到 Runx2 蛋白的表达较对照组显著增加,这与 Shan 等研究结果相一致。BMPs 是转化生长因子(TGF)- β 超家族的成员之一,是骨形成重要的调控子,其中 BMP-2 与动脉钙化密切相关,具有强大的成骨细胞分化作用,可诱导成骨细胞相关基因表达的上调,是 VSMCs 成骨样分化的一个表型特异性指标之一^[11]。本文结果显示, β -GP 可有效地刺激小鼠 VSMCs 使 BMP-2 的表达增加,与对照组比较有显著性差异。以上结果表明在本实验中我们成功构建了动脉钙化的细胞模型。

长春西汀作为一种脑血管扩张剂,已被广泛应用于缺血性脑血管疾病的治疗。最近研究发现长

春西汀可以通过抑制 VSMCs 的增殖及迁移来抑制病理性血管重塑^[15],通过阻止活性氧活化来抑制高糖诱导的大鼠 VSMCs 的增殖^[16]。然而其对小鼠 VSMCs 成骨样分化的影响尚无报道,因此,在本实验中我们采用 β -GP 诱导的动脉钙化细胞模型来探讨长春西汀对于 VSMCs 成骨样分化的作用。尽管在以往的研究中,研究者应用 25 ~ 75 μ M 长春西汀干预 3d 显著抑制了 VSMCs 的增殖^[15],而我们的实验结果显示应用 20 ~ 100 μ M 长春西汀干预小鼠的 VSMCs,大部分细胞均死亡,应用 5 ~ 15 μ M 长春西汀培养细胞,观察到此浓度范围适合细胞生长。在本实验中我们应用 10mM β -GP 诱导 VSMCs 建立经典的动脉钙化细胞模型,应用 10 μ M 长春西汀干预,通过检测 ALP 活性、Runx2 和 BMP-2 的表达以及矿化结节的形成来研究长春西汀对于动脉钙化的影响。结果显示长春西汀可以减弱 ALP 活性、减少 Runx2 和 BMP-2 的表达,茜素红染色显示长春西汀可减少矿化结节的形成。这些结果提示长春西汀可抑制 VSMCs 的成骨样分化。最新研究表明,长春西汀可通过抑制 NF- κ B 的活化来发挥其对肺部炎症^[17]、海藻多糖胶诱导的小鼠炎症性痛觉过敏^[18]以及黄斑变性^[19]等的保护作用。NF- κ B 是细胞信号通路中重要的转录调节因子之一,受上游信号活化后,NF- κ B 的 p65 亚基可向核内转位并进一步与 DNA 结合发挥其转录调控作用,目前已发现 NF- κ B 的转录调控与细胞存活、分化和增殖等过程密切相关^[20]。为了探讨长春西汀是否也通过 NF- κ B 通路发挥其抑制 VSMCs 成骨样分化的作用,我们检测了 NF- κ B p65 在 VSMCs 核内的表达,结果显示与对照组相比,钙化组 NF- κ B p65 的表达显著增加,这一结果提示 NF- κ B 可能参与了动脉钙化的过程,为了进一步研究长春西汀对于 NF- κ B 的影响,我们在 β -GP 刺激的基础上使用 10 μ M 长春西汀干预小鼠 VSMCs 检测到 NF- κ B p65 的表达显著减少。以上实验结果提示我们长春西汀可能通过 NF- κ B 信号通路抑制小鼠 VSMCs 成骨样分化。然而长春西汀抑制 NF- κ B 的具体机制仍不明确,尚需进一步的研究。

综上所述,我们应用 β -GP 诱导的小鼠 VSMCs 作为动脉钙化的细胞模型,发现长春西汀可能通过 NF- κ B 信号途径抑制 β -GP 诱导的小鼠 VSMCs 成骨样分化,然而其机制尚不清楚。后续研究可利用动物模型来验证长春西汀对动脉钙化的保护作用。

参考文献:

- [1] Johnson R C, Leopold J A, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications [J]. *Circ Res*, 2006, 99(10): 1044-1059. DOI: 10.1161/01.RES.0000249379.55535.21.
- [2] Detrano R C, Doherty T M, Davies M J, et al. Predicting coronary events with coronary Calcium: pathophysiologic and clinical problems [J]. *Curr Probl Cardiol*, 2000, 25(6): 374-402. DOI: 10.1067/med.2000.104848.
- [3] Yao Y, Bennett B J, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2010, 107(4): 485-494. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219071.
- [4] Olesen P, Nguyen K, Wogensen L, et al. Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose insulin [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2): H1058-H1064. DOI: 10.1152/ajpheart.00047.2006.
- [5] Bönöczk P, Panczel G, Nagy Z. Vinpocetine increases cerebral blood flow and oxygenation in stroke patients: a near infrared spectroscopy and transcranial Doppler study [J]. *Eur J Ultrasound*, 2002, 15(1-2): 85-91. DOI: 10.1016/S0929-8266(02)00006-X.
- [6] Patyar S, Prakash A, Modi M, et al. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases [J]. *Pharmacological Reports*, 2011, 63(3): 618-628.
- [7] Ruiz-Miyazawa K W, Pinho-Ribeiro F A, Zarpelon A C, et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF-kappa B [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 237: 9-17. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.05.007.
- [8] Vereshchagin V K. Effect of vinpocetine on cerebral circulation in rats after exposure to radiation [J]. *Eksp Klin Farmakol*, 2003, 66(5): 14-16.
- [9] Liang Q H, Jiang Y, Zhu X, et al. Ghrelin attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells through the ERK pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e33126. DOI: 10.1371/journal.pone.0033126.
- [10] Radcliff K, Tang T B, Lim J, et al. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways [J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 398-400. DOI: 10.1161/01.RES.0000157671.47477.71.
- [11] Hruska K A, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2005, 97(2): 105-114. DOI: 10.1161/01.RES.00000175571.53833.6c.
- [12] Dhore C R, Cleutjens J P, Lutgens E, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): 1998-2003. DOI: 10.1161/hq1201.100229.
- [13] Shan P F, Lu Y, Cui R R, et al. Apelin attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17938. DOI: 10.1371/journal.pone.0017938.
- [14] Li J, Zhang B, Huang Z, et al. Taurine prevents beta-glycerophosphate-induced calcification in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Heart Vessels*, 2004, 19(3): 125-131. DOI: 10.1007/s00380-003-0744-6.
- [15] Cai Y, Knight WE, Guo S, et al. Vinpocetine suppresses pathological vascular remodeling by inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343(2): 479-488. DOI: 10.1124/jpet.112.195446.
- [16] Wang K, Wen L, Peng W, et al. Vinpocetine attenuates neointimal hyperplasia in diabetic rat carotid arteries after balloon injury [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96894. DOI: 10.1371/journal.pone.0096894.
- [17] Jeon K I, Xu X B, Aizawa T, et al. Vinpocetine inhibits NF-kappa B-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(21): 9795-9800. DOI: 10.1073/pnas.0914414107.
- [18] Ruiz-Miyazawa K W, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro F A, et al. Vinpocetine reduces Carrageenan-Induced inflammatory hyperalgesia in mice by inhibiting oxidative stress, cytokine production and NF-kappa B activation in the paw and spinal cord [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 0118942. DOI: 10.1371/journal.pone.0118942.
- [19] Liu R T, Wang A K, To E, et al. Vinpocetine inhibits amyloid-beta induced activation of NF-kappa B, NLRP3 inflammasome and cytokine production in retinal pigment epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 127: 49-58. DOI: 10.1016/j.exer.2014.07.003.
- [20] Anest V, Hanson J L, Cogswell P C, et al. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression [J]. *Nature*, 2003, 423(6940): 659-663. DOI: 10.1038/nature01648.

(收稿日期 2015-02-09)