

研究论文



朱东兴, 博士, 教授 / 博导, 研究方向: 心血管钙化是指磷酸钙盐在心血管组织中的异常沉积, 其是糖尿病、动脉粥样硬化、高血压和慢性肾病等疾病患者普遍具有的共同血管病理表现。聚焦心血管钙化, 通过细胞、动物模型和临床标本, 采用高通量测序、生物信息学、分子生物学等先进技术手段, 深入研究心血管钙化发病机制, 旨在为心血管钙化的早期诊断和防治提供新的靶点。2017年回国后在广州医科大学基础医学院组建心血管钙化研究团队, 先后担任副教授 / 教授, 在心血管钙化领域取得了一定的研究成果。目前已获得包括国家自然科学基金面上、青年基金, 以及广东省自然科学基金在内的多项科研课题, 课题组近年来的相关研究成果先后发表在 *Cardiovascular Research*、*Vascular Pharmacology*、*Trends in Biochemical Sciences*、*Journal of Biological Chemistry* 和 *Molecular and Cellular Endocrinology* 等知名杂志上, 发表论文 20 余篇。担任广东省药理学学会心血管专业委员会常务委员、广东省病理生理学会心血管专业委员会委员、*Frontiers in Cardiovascular Medicine* 特邀编辑、*Frontiers in Cell and Developmental Biology* 特邀副主编、《中国动脉硬化杂志》青年编委、国家自然科学基金委员会 / 广东省自然科学基金委员会通讯评审。

丹参酮IIa通过NF- κ B和 β -catenin信号通路抑制血管钙化

钟慧^{1, #}, 李带琪^{2, #}, 王苏樱², 陈洁仪², 陈佳欣¹, 谭笑¹, 王月恒¹, 谢宇晨¹, 朱东兴^{1, *}

广州医科大学¹基础医学院基础医学研究中心; ²生命科学学院, 广州 511436

摘要: 丹参酮IIa是我国传统中医药丹参的主要有效成分之一, 已被广泛用于治疗多种心脑血管疾病。血管钙化是慢性肾病、糖尿病、高血压和动脉粥样硬化患者最常见的血管病理改变。然而, 丹参酮IIa是否抑制血管钙化尚不清楚。本研究采用血管平滑肌细胞和血管环钙化模型以及高剂量维生素D₃诱导的小鼠血管钙化模型, 旨在探讨丹参酮IIa抑制血管钙化的作用及其可能机制。茜素红染色和钙离子定量结果显示, 丹参酮IIa显著抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化。qPCR和Western blot结果表明丹参酮IIa抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化。丹参酮IIa也显著抑制高剂量维生素D₃诱导的小鼠血管钙化和血管的成骨样转分化。机制研究显示, 丹参酮IIa抑制正常血管平滑肌细胞中NF- κ B和 β -catenin信号通路的激活。此外, 与丹参酮IIa类似, NF- κ B和 β -catenin特异性抑制剂SC75741和LF3也抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化。这些结果表明, 丹参酮IIa至少部分通过抑制NF- κ B和 β -catenin信号通路降低血管钙化的发生, 提示丹参酮IIa可能是治疗血管钙化的潜在药物。

关键词: 丹参酮IIa; 血管钙化; 血管平滑肌细胞; NF- κ B和 β -catenin信号通路

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82170428) and the ‘Yangcheng Scholar’ Grant of Guangzhou (No. 202032768) to ZHU Dong-Xing, ‘Climb Plan’ Science and Technology Innovation Fund for The Undergraduate Students in Guangdong Province (No. pdjh2021b0418) to LI Dai-Ying, and Research Training Grant for The Undergraduates of Guangzhou Medical University (No. S20211057058) to CHEN Jie-Yi.

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-20-37103613; E-mail: dongxing.zhu@gzhmu.edu.cn

Tanshinone IIa attenuates vascular calcification through inhibition of NF- κ B and β -catenin signaling pathways

ZHONG Hui^{1, #}, LI Dai-Ying^{2, #}, WANG Su-Ying², CHEN Jie-Yi², CHEN Jia-Xin¹, TAN Xiao¹, WANG Yue-Heng¹, XIE Yu-Chen¹, ZHU Dong-Xing^{1, *}

¹Biomedical Research Center, Basic Medical School; ²School of Life Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

Abstract: Tanshinone IIa is a key ingredient extracted from the traditional Chinese medicine *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), and is widely used to treat various cardiovascular diseases. Vascular calcification is a common pathological change of cardiovascular tissues in patients with chronic kidney disease, diabetes, hypertension and atherosclerosis. However, whether Tanshinone IIa inhibits vascular calcification and the underlying mechanisms remain largely unknown. This study aims to investigate whether Tanshinone IIa can inhibit vascular calcification using high phosphate-induced vascular smooth muscle cell and aortic ring calcification model, and high dose vitamin D₃ (vD₃)-induced mouse models of vascular calcification. Alizarin red staining and calcium quantitative assay showed that Tanshinone IIa significantly inhibited high phosphate-induced vascular smooth muscle cell and aortic ring calcification. qPCR and Western blot showed that Tanshinone IIa attenuated the osteogenic transition of vascular smooth muscle cells. In addition, Tanshinone IIa also significantly inhibited high dose vD₃-induced mouse aortic calcification and aortic osteogenic transition. Mechanistically, Tanshinone IIa inhibited the activation of NF- κ B and β -catenin signaling in normal vascular smooth muscle cells. Similar to Tanshinone IIa, inhibition of NF- κ B and β -catenin signaling using the chemical inhibitors SC75741 and LF3 attenuated high phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. These results suggest that Tanshinone IIa attenuates vascular calcification at least in part through inhibition of NF- κ B and β -catenin signaling, and Tanshinone IIa may be a potential drug for the treatment of vascular calcification.

Key words: Tanshinone IIa; vascular calcification; vascular smooth muscle cells; NF- κ B and β -catenin signaling pathways

血管钙化是指磷酸钙盐晶体以羟基磷灰石为主要形式在血管和心脏瓣膜等心血管组织中的异常沉积^[1], 它是在动脉粥样硬化、糖尿病、慢性肾病和高血压患者中普遍存在的血管病理改变^[2]。血管钙化显著增加血管壁僵硬性、降低血管顺应性, 是不良心血管事件发生的重要独立危险因素^[3]。血管钙化的不良临床后果主要与其在血管壁中发生的位置相关。血管内膜钙化显著增加动脉粥样硬化斑块破裂的风险, 加速心肌梗死的发生^[3], 而血管中膜钙化则与脉搏波速度、血压升高和收缩期高血压密切相关^[4]。目前尚无有效药物或者干预措施治疗血管钙化。

既往认为, 血管钙化是一个被动的、不可避免的退行性病变过程。然而, 近年来的大量证据表明, 血管钙化是一个主动的、可调控的、且高度类似于生理性骨形成的病理过程^[5]。血管平滑肌细胞是构成血管壁的主要细胞成分, 在血管钙化过程中发挥非常重要的作用。我们及前人研究发现, 采用高磷处理血管平滑肌细胞模拟慢性肾病患者高磷血症可显著促进其钙化和向成骨样细胞转分化^[6-8]。血管钙化过程中血管平滑肌细胞的表型转换主要表现为

血管平滑肌细胞标志物如平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α) 和 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的丢失, 及成骨样分化标志物如 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2)、同源盒基因 2 (Msh homeobox 2, Msx2) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 的获得^[8]。研究表明, 骨形成相关信号通路如 Wnt (wingless-related integration site)/ β -catenin、骨形态蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)/SMAD 和核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 促进血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化和钙化^[9-11]。寻找新的血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化的调控因子对于开发防治血管钙化的潜在药物和干预措施具有十分重要的意义。

丹参酮 IIa (Tanshinone IIa) 是从我国传统中药丹参中分离出来的最丰富的脂溶性成分, 是丹参的主要有效成分之一, 被广泛用于治疗心肌梗死、动脉粥样硬化等多种心脑血管疾病^[12]。丹参酮 IIa 主要通过包括抗细胞增殖、抗炎症和抗氧化等多种机制起到保护心血管的作用。研究发现, 丹参酮 IIa 抑制氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein)

protein, ox-LDL) 诱导的血管炎症和血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 减少 *ApoE*^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的形成^[13]。此外, 丹参酮 IIa 可抑制 NF- κ B 信号通路, 改善脂多糖诱导的血管平滑肌细胞炎症反应^[14]。也有研究发现, 丹参酮 IIa 可抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥大和心肌细胞的增殖与迁移^[15, 16]。迄今, 对于丹参酮 IIa 在血管钙化过程中的作用及其具体调控机制尚不清楚。

本研究通过高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环体外钙化模型及高剂量维生素 D₃ (vitamin D₃, vD₃) 诱导的小鼠血管钙化动物模型, 探讨丹参酮 IIa 对血管钙化的调控作用及其具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自广州晴乐生命科学有限公司, 饲养于广州医科大学实验动物中心 SPF 级环境动物房, 室内灯光明暗交替的周期是 12 h, 给予足量 SPF 级维持颗粒饲料 (广州晴乐生命科学有限公司), 自由饮水。所有实验

操作均根据广州医科大学实验动物管理委员会的规定进行, 并获得批准。

1.2 主要试剂 丹参酮 IIa 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, vD₃、茜素红、钙离子定量试剂盒购于美国默克 Sigma 公司, RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购于大连宝生物有限公司, 引物由广州捷瑞生物有限公司合成, 本研究中所使用的引物序列见表 1。本研究中所使用的抗体具体信息见表 2。本研究中所使用的细胞培养基、胎牛血清、细胞培养板均购于美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 高剂量 vD₃ 诱导的血管钙化小鼠模型 参考前人文献^[17], 选取雄性 6 周龄小鼠, 分为对照组、vD₃ 组和 vD₃+ 丹参酮 IIa 组。对照组皮下注射等体积生理盐水, vD₃ 组皮下注射高剂量 vD₃ (5 × 10⁵ IU/kg), 每天注射一次, 连续 3 天。同时给予腹腔注射等体积 DMSO, 每天一次, 连续注射 7 天。vD₃+ 丹参酮 IIa 组在第一次注射 vD₃ 时, 同时腹腔注射丹参酮 IIa (5 mg/kg), 每天注射一次, 连续注射

表1. RT-qPCR引物序列

Table 1. RT-qPCR primers used in this study

Gene symbol	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Runx2	ACCATAACAGTCTTCACAAATCCT	CAGGCGATCAGAGAACAAACTA
Bmp2	GCTTCTTAGACGGACTGCGG	GCAACACTAGAAGACAGCGGGT
Msx2	GGAGCACCGTGGATACAGG	TAGAAGCTGGGATGTGGTGAA
Opg (Tnfrsf11b)	CAGAGAAGCCACGCCAAAAGTG	AGCTGTGTCTCCGTTTTATCCT
Osteocalcin (Ocn)	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
Alpl	GGGACGAATCTCAGGGTACA	AGTAACTGGGGTCTCTCTCTTT
β -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

表2. Western blot抗体信息

Table 2. Source of primary antibodies used for Western blot

Antibodies	Source	Catalogue no.	Dilution
RUNX2	Abcam	ab192256	1:2 000 in 5% BSA
MSX2	Abcam	ab223692	1:2 000 in 5% BSA
Erk1/2	CST	8814	1:2 000 in 5% BSA
p-Erk1/2	CST	4370	1:2 000 in 5% BSA
p-Akt	CST	#4060	1:2 000 in 5% BSA
Akt	CST	#4691	1:2 000 in 5% BSA
NF- κ B p65	CST	#8242	1:2 000 in 5% BSA
NF- κ B p-p65	Abcam	ab183559	1:2 000 in 5% BSA
β -catenin	CST	#8480	1:2 000 in 5% BSA
Smad1/5/9	CST	#12656	1:2 000 in 5% BSA
p-Smad1/5/9	CST	#12656	1:2 000 in 5% BSA
β -actin	Santa Cruz	sc-81178	1:10 000 in 5% BSA

BSA: bovine serum albumin.

7天。实验结束后,小鼠麻醉处死取材进行后续实验。

1.4 原代小鼠血管平滑肌细胞的分离和培养 小鼠麻醉灌流后,胸部正中切口取出主动脉,剥离脂肪组织,纵向切开主动脉,暴露血管内皮层。采用1 mg/mL胰酶消化血管10 min,之后采用弯镊刮除血管内皮层。将血管剪切成2~3 cm小块,采用425 U/mL 2型胶原酶消化5 h。将离心获得的细胞重悬于含有10% FBS、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的 α -MEM细胞培养基,并置于T25细胞培养瓶中培养一周。细胞生长至80%时传代。为保持血管平滑肌细胞的生物稳定性,本研究中采用2~4代细胞用于后续实验。

1.5 高磷诱导血管平滑肌细胞钙化 将血管平滑肌细胞种植于6孔细胞培养板中,每孔 1×10^5 个细胞。待细胞长满后,分别采用正常培养基(1 mmol/L Pi)或钙化培养基(3 mmol/L Pi)培养细胞14天,诱导血管平滑肌细胞钙化。以后每3~4天换液一次。同时分别给予等体积DMSO(对照)或1 μ mol/L丹参酮IIa处理14天。实验结束后,采用茜素红染色或钙离子定量检测试剂盒检测血管钙化情况。

1.6 茜素红染色 血管平滑肌细胞钙化模型诱导分化结束后,弃去培养基,用 $1 \times$ PBS冲洗两次,每孔加入1 mL 4%多聚甲醛固定10 min。弃去多聚甲醛,用 $1 \times$ PBS冲洗3次,每孔加入1 mL 2%茜素红溶液(pH 4.2),室温下染色10 min。弃去茜素红染色液,用蒸馏水冲洗3次。将细胞培养板倒置于显微镜下拍照。血管环钙化模型经诱导分化结束后,将血管环置于95%无水乙醇中固定24 h,用0.0016%茜素红/1%氢氧化钾溶液染色30 h后,用0.5%氢氧化钾溶液冲洗,直至背景干净。将染色后的血管环置于倒置显微镜下拍照。

1.7 钙离子定量检测 血管平滑肌细胞钙化模型诱导结束后,弃去细胞培养基,用 $1 \times$ PBS冲洗两次,每孔加入1 mL 0.6 mol/L HCl,24 h后取出HCl放入离心管中,采用钙离子定量检测试剂盒(Sigma, MAK022-1KT)检测血管平滑肌细胞中钙离子沉积量。细胞培养板每孔用 $1 \times$ PBS冲洗两次,加入200 μ L 1 mmol/L氢氧化钠/0.1% SDS溶液裂解,收取细胞蛋白并进行定量。血管平滑肌细胞钙离子沉积量表示为 μ g/mg protein。

1.8 高磷诱导血管环钙化 小鼠麻醉灌流后,胸部正中切口取出主动脉,剥离脂肪组织,将主动脉剪切至2~3 cm左右的血管环,置于6孔细胞培养

板中,每孔5~6个血管环,分别采用正常培养基(1 mmol/L Pi)或钙化培养基(3 mmol/L Pi)培养7天。同时分别给予等体积DMSO(对照)或1 μ mol/L丹参酮IIa处理7天。实验结束后,采用茜素红染色或钙离子定量检测试剂盒检测血管钙化情况。

1.9 RNA提取和荧光定量PCR (qPCR) 将血管平滑肌细胞种植于6孔细胞培养板中,分别给予DMSO(对照)或1 μ mol/L丹参酮IIa处理48 h后,提取RNA和收取蛋白样本,分别采用qPCR和Western blot检测成骨基因的表达。采用TaKaRa MiniBEST Universal RNA提取试剂盒提取总RNA,使用Nanodrop 2000测量样本浓度,采用TaKaRa PrimeScript™ RT Master Mix将1 μ g各样本RNA进行反转录,使用QuantStudio 5实时荧光定量PCR仪对目的基因进行扩增。以 β -actin作为内参。基因的表达水平以得到的相应的Ct值用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.10 Western blot 向收集到的细胞或血管样本中加入100 μ L预冷的RIPA裂解液(碧云天公司),冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C离心后吸取上清液于新的EP管中。测定蛋白浓度后,将10 μ g各样本蛋白进行10% SDS-PAGE电泳,将凝胶上蛋白电转到0.4 μ m PVDF膜上,采用5% BSA封闭2 h。加入目的蛋白一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗3次后,加入相应HRP偶联的二抗孵育1 h,采用ECL化学发光凝胶成像仪曝光,检测蛋白表达情况。

1.11 统计学分析 实验数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用GraphPad Prism 6进行统计学分析。采用Shapiro-Wilk检验正态分布。符合正态分布的两组之间采用非配对Student's *t*检验,多组之间采用单因素方差分析和Bonferroni事后分析。对于非正态分布的数据,两组之间采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学显著意义。

2 结果

2.1 丹参酮IIa抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化

为了明确丹参酮IIa对血管钙化的调控作用,我们采用了高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化模型。茜素红染色和钙离子定量检测结果显示,1 μ mol/L丹参酮IIa处理显著抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化(图1A & B, $P < 0.001$)。进一步实验发现,1 μ mol/L丹参酮IIa处理同样显著抑制高磷诱导的血管环钙化(图1C & D, $P < 0.001$)。

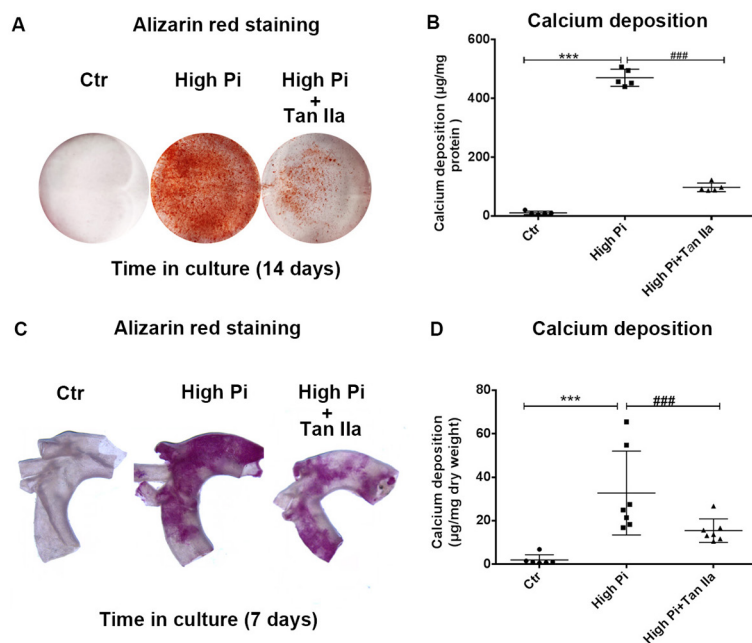


图 1. 丹参酮IIa抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化

Fig. 1. Tanshinone IIa (Tan IIa) inhibits high phosphate (Pi)-induced calcification in vascular smooth muscle cells and aortic ring *in vitro*.

A: Representative images of alizarin red staining of vascular smooth muscle cells at day 14 (Plate view). Murine vascular smooth muscle cells were cultured with control or 3 mmol/L inorganic phosphate medium, and treated with DMSO or 1 $\mu\text{mol/L}$ Tan IIa for 14 days. *B*: Calcium quantitative assay showed that 1 $\mu\text{mol/L}$ Tan IIa significantly inhibited calcium deposition in vascular smooth muscle cells. $n = 5$. *C*: Representative images of alizarin red staining of aortic rings at day 7 (Microscopic view). Murine aortic rings were cultured with control or 5 mmol/L inorganic phosphate medium, and treated with DMSO or 1 $\mu\text{mol/L}$ Tan IIa for 7 days. *D*: Calcium quantitative assay showed that 1 $\mu\text{mol/L}$ Tan IIa significantly inhibited calcification in aortic ring. $n = 7$. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc*-test. *** $P < 0.001$, #### $P < 0.001$.

这些实验结果表明，丹参酮 IIa 在体外对血管钙化具有明显的抑制作用。

2.2 丹参酮IIa抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化

我们及前人研究发现，血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化在血管钙化过程中发挥关键作用^[6-8]，因此，我们检测了丹参酮 IIa 是否影响正常血管平滑肌细胞中成骨样分化标志基因的表达。结果显示，1 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 IIa 处理显著抑制血管平滑肌细胞中 Runx2、Bmp2、Msx2、Ocn 和 Alpl 的 mRNA 表达水平 (图 2A)。Western blot 结果表明，1 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 IIa 处理抑制血管平滑肌细胞中成骨样分化标志基因 RUNX2 和 MSX2 的蛋白表达水平 (图 2B-D)。这些结果提示，丹参酮 IIa 可能通过抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化，从而抑制血管钙化。

2.3 丹参酮IIa抑制vD₃诱导的血管钙化和向成骨样转分化

为了明确丹参酮 IIa 在动物水平上对血管钙化

的抑制作用，我们采用了高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管钙化模型。茜素红和钙离子定量结果显示，丹参酮 IIa 处理显著抑制高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管钙化 (图 3A & B, $P < 0.001$)。荧光定量 PCR 结果显示，在 vD₃ 诱导的小鼠钙化血管中，成骨样标志基因 Bmp2、Msx2 和 Ocn 的 mRNA 表达水平显著上升，而 Runx2 的 mRNA 则无显著变化 (图 3C)。丹参酮 IIa 处理显著抑制高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管中 Bmp2、Msx2 和 Ocn 的 mRNA 表达上升 (图 3C, $P < 0.05$)。Western blot 结果表明，丹参酮 IIa 处理抑制高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管中 MSX2 的蛋白表达上升 (图 3D & E)。这些结果表明，丹参酮 IIa 在动物水平上抑制血管钙化和向成骨样转分化。

2.4 丹参酮IIa至少部分通过抑制NF- κ B和 β -catenin信号通路降低血管钙化

为了明确丹参酮 IIa 抑制血管钙化的可能机制，我们评估了丹参酮 IIa 对正常血管平滑肌细胞中多个血管钙化相关信号通路的影响。结果显示，

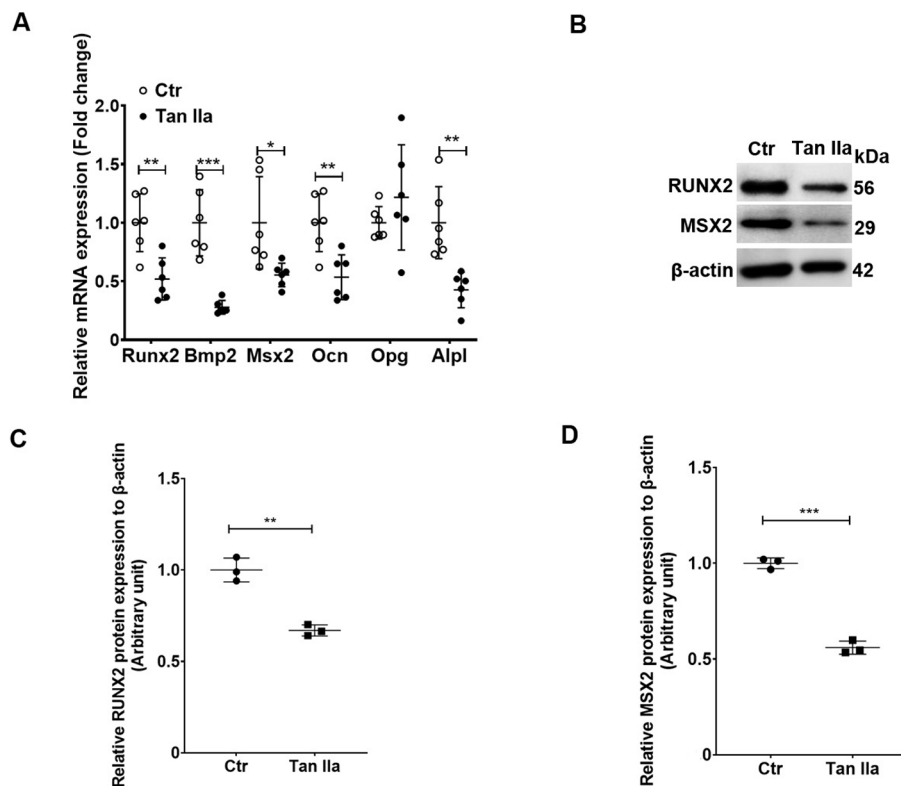


图 2. 丹参酮IIa抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化

Fig. 2. Tanshinone IIa (Tan IIa) attenuates the osteogenic gene expression in vascular smooth muscle cells. Murine vascular smooth muscle cells were treated with DMSO or 1 $\mu\text{mol/L}$ Tan IIa for 48 h. *A*: RT-qPCR for mRNA expression of the osteogenic gene Runx2, Bmp2, Msx2, Osteocalcin (Ocn), Opg and Alpl in vascular smooth muscle cells. $n = 6$. *B*: Western blotting for RUNX2 and MSX2 protein expression in vascular smooth muscle cells. *C*: Semi-quantification analysis of RUNX2 protein expression. $n = 3$. *D*: Semi-quantification analysis of MSX2 protein expression. $n = 3$. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

1 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 IIa 抑制血管平滑肌细胞中 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路的激活 (图 4A & B), 但对 Smad、Akt 和 Erk1/2 信号通路无显著影响 (图 4C~E)。茜素红和钙离子定量结果显示, 与丹参酮 IIa 处理类似, 1 $\mu\text{mol/L}$ NF- κ B 抑制剂 SC75741 (购自 Sigma, 中国) 或 10 $\mu\text{mol/L}$ β -catenin 抑制剂 LF3 (购自 Sigma, 中国) 处理显著抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化 (图 4F & G)。这些结果提示, 丹参酮 IIa 至少部分通过抑制 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路延缓血管钙化的发生。

3 讨论

丹参酮 IIa 是我国传统中药丹参的主要活性成分之一, 已被广泛应用于治疗多种心脑血管疾病^[17]。新近研究表明, 丹参酮 IIa 可通过改变锌指蛋白 KLF4 (Krüppel like factor 4) 介导的血管平滑肌细胞表型转化, 从而抑制血管重塑^[18]。也有研究显示,

丹参酮 IIa 抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移和炎症反应^[19–21]。血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化是血管钙化过程中的关键事件。因此, 我们推测丹参酮 IIa 可能通过调控血管平滑肌细胞功能从而抑制血管钙化的发生。在本研究中, 我们发现丹参酮 IIa 处理抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化, 以及高剂量 vD_3 诱导的小鼠血管钙化。进一步研究发现, 丹参酮 IIa 处理显著抑制血管平滑肌细胞中成骨样分化标志基因如 Runx2、Msx2、Bmp2 和 Ocn 的 mRNA 表达水平, 提示丹参酮 IIa 抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化。此外, 我们发现丹参酮 IIa 抑制血管平滑肌细胞中 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路的激活。与丹参酮 IIa 类似, NF- κ B 和 β -catenin 信号通路特异性抑制剂 SC75741 和 LF3 抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化。这些结果提示, 丹参酮 IIa 可能通过调控血管平滑肌细胞中 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路, 抑制血管平滑

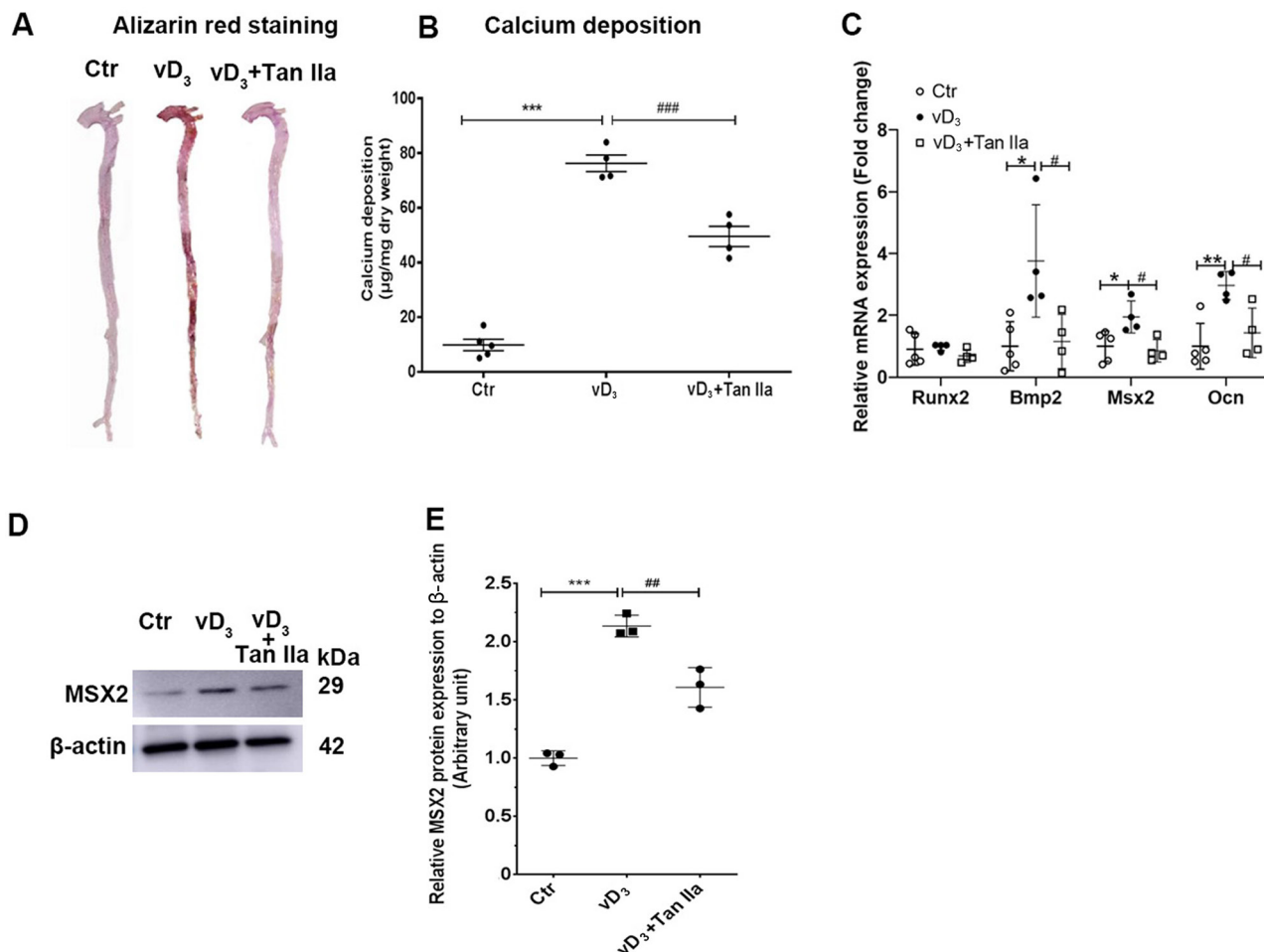


图 3. 丹参酮IIa抑制高剂量vD₃诱导的小鼠血管钙化和血管成骨基因的表达

Fig. 3. Tanshinone IIa (Tan IIa) reduces high dose vitamin D₃ (vD₃)-induced mouse aortic calcification and osteogenic transition. *A*: Representative images of alizarin red staining of mouse whole arteries. *B*: Calcium quantitative assay showed that calcium deposition was reduced in arteries isolated from mice treated with Tan IIa. *n* = 4. *C*: RT-qPCR for the osteogenic gene expression in mouse arteries including Runx2, Bmp2, Msx2 and Ocn. *n* = 4. *D*: Western blot for MSX2 protein expression in mouse arteries. *E*: Semi-quantification analysis of MSX2 protein expression. *n* = 3. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc*-test. Data are presented as mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001.

肌细胞向成骨样细胞转分化, 从而延缓血管钙化的发生。

高磷血症是慢性肾病最常见的并发症, 与血管钙化密切相关^[22]。我们及前人在体外模拟慢性肾病高磷血症, 建立了高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化模型^[6-8]。本研究结果显示, 1 µmol/L 丹参酮 IIa 处理显著抑制高磷诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化。在本研究中, 我们也在动物水平上评估了丹参酮 IIa 对血管钙化的影响。高剂量 vD₃ 处理小鼠可显著增加血清中的钙磷浓度、降低血清中钙化抑制因子 fetuin-A 的水平、诱导血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化, 从而引起血管钙化^[23]。该动物模型具有诱导时间较短、成活率高和病变典

型等优点。结果表明, 丹参酮 IIa 显著抑制高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管钙化。与该研究结果一致, 前人研究发现, 丹参酮 IIa 抑制大鼠动脉粥样硬化斑块的钙化^[24]。

前期研究发现, 在血管钙化过程中, 成骨样分化标志物如 Runx2、Msx2、Bmp2 等表达显著上升^[25]。研究显示, 在血管平滑肌细胞中特异性过表达 Runx2 或 Bmp2 显著促进血管钙化的发生^[26, 27]。在本研究中, 我们发现丹参酮 IIa 处理显著抑制血管平滑肌细胞成骨样分化标志物 Runx2、Msx2、Bmp2 和 Ocn 的 mRNA 表达水平。此外, 丹参酮 IIa 抑制高剂量 vD₃ 诱导的小鼠血管中成骨样分化标志物 Bmp2、Msx2 和 Ocn 的 mRNA 表达。这些结果提示, 丹参

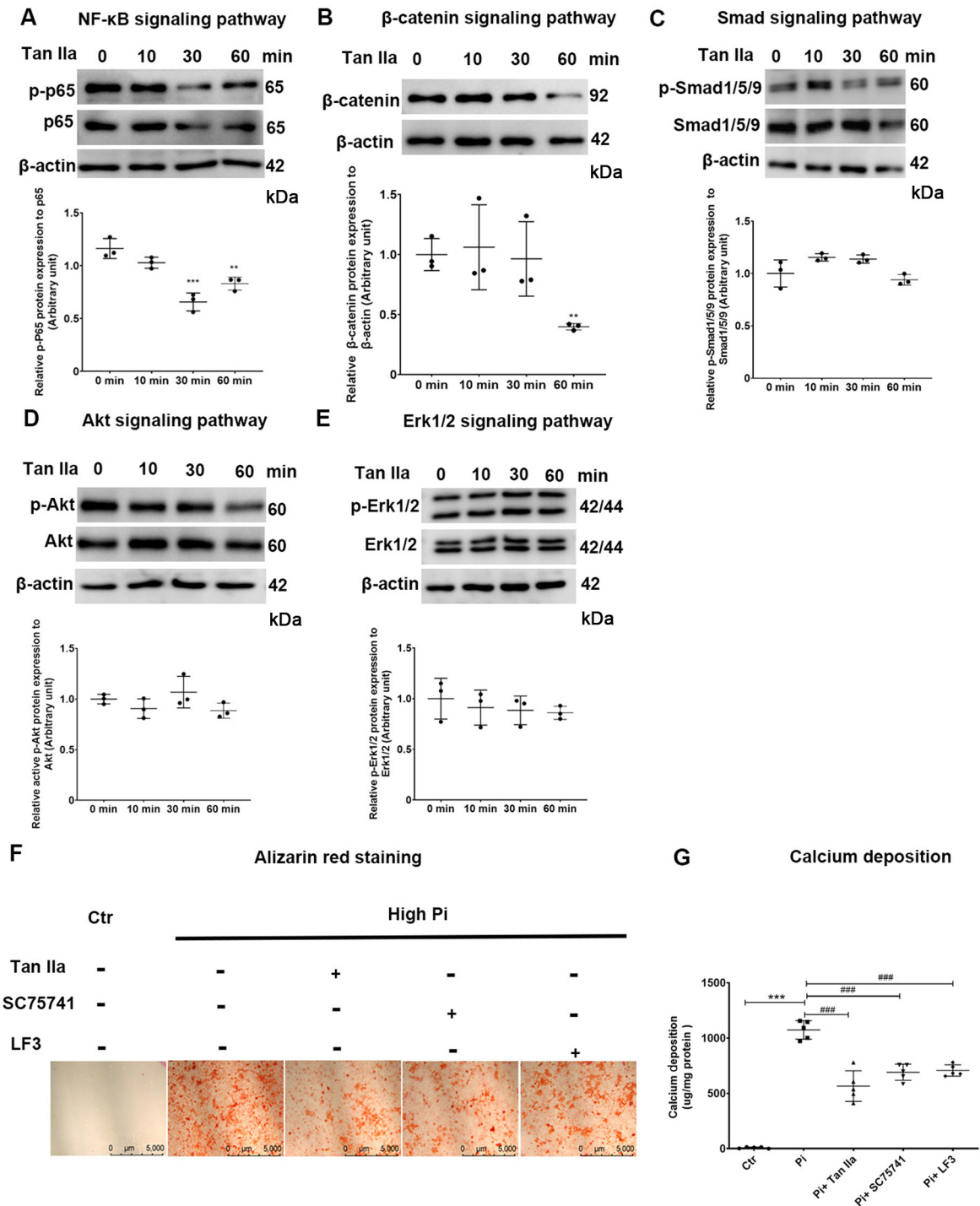


图 4. 丹参酮IIa至少部分通过抑制NF- κ B和 β -catenin信号通路延缓血管钙化

Fig. 4. Tanshinone IIa (Tan IIa) attenuates high phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification at least in part through inhibition of NF- κ B and β -catenin signaling pathways. *A–E*: Representative images and semi-quantification analysis of Western blot for the NF- κ B, β -catenin, Smad, Akt and Erk1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. Murine vascular smooth muscle cells were treated with 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Tan IIa at the indicated time. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs 0 min. *F*: Murine vascular smooth muscle cells were pretreated with 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SC75741 (NF- κ B inhibitor) or 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LF3 (β -catenin inhibitor) for 2 h, and incubated with control of high phosphate medium in the absence or presence of 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Tan IIa for 14 days. Representative images of alizarin red staining at day 14. Scale bar, 5 000 μm . *G*: Calcium quantitative assay showed that Tan IIa or inhibition of NF- κ B and β -catenin signaling attenuated high phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. $n = 5$. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc*-test. $***P < 0.001$, $####P < 0.001$.

酮 IIa 可能通过抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化, 从而减少血管钙化的发生。

血管平滑肌细胞中多个细胞信号通路调控血管平滑肌细胞钙化和向成骨样细胞转分化, 如 NF- κ B、 β -catenin、Smad、Akt 和 Erk1/2 信号通路^[28]。在本研究中, 我们发现丹参酮 IIa 抑制血管平滑肌细胞中 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路。与我们的研究结果一致, 有研究发现丹参酮 IIa 抑制小鼠小胶质瘤细胞中 NF- κ B 信号通路的激活^[29]。此外, 也有研究证实, 丹参酮 IIa 抑制大鼠心肌细胞中 β -catenin 信号通路^[30]。丹参酮 IIa 通过何种机制抑制 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路有待进一步研究。

NF- κ B 信号通路在心血管疾病病理进程中发挥重要作用。NF- κ B 的主要亚基 p65 被激活后, 转移到细胞核内, 直接调控其靶基因的表达, 从而在细胞增殖、分化和炎症中发挥重要的调控作用^[31]。前人研究发现, 激活 NF- κ B 信号通路促进血管钙化的发生^[32]。新近研究证实, NF- κ B 信号通路可促进瓣膜间质细胞的炎症、向成骨样细胞转分化和钙化^[33]。 β -catenin 信号通路在胚胎发育和维持组织稳态中具有重要的作用。前人研究发现, β -catenin 通过直接调控 Runx2 的表达促进血管钙化^[9]。也有研究证实, Bmp2 或 Msx2 通过激活 β -catenin 促进心血管钙化^[34, 35]。这些研究表明, NF- κ B 和 β -catenin 信号通路在血管钙化和血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化过程中发挥关键作用。本研究结果显示, 丹参酮 IIa 对正常血管平滑肌细胞中 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路具有明显的抑制作用。进一步研究发现, 与丹参酮 IIa 处理类似, NF- κ B 和 β -catenin 信号通路抑制剂可显著减少高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化。这些结果表明, 丹参酮 IIa 可能部分通过抑制 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路的激活, 从而延缓血管钙化的发生。

综上所述, 本研究通过多种模型证实丹参酮 IIa 对血管钙化具有显著的抑制作用, 且丹参酮 IIa 可能部分通过抑制 NF- κ B 和 β -catenin 信号通路, 从而抑制血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化, 进而延缓血管钙化的发生。本研究可为防治血管钙化提供一个潜在的思路。

参考文献

- 1 He P, Yu H, Jiang L, Chen Z, Wang S, Macrae VE, Fu X, Zhu D. Hdac9 inhibits medial artery calcification through down-regulation of osterix. *Vascul Pharmacol* 2020; 132: 106775.
- 2 Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: An update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93: 365–373.
- 3 Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 185–197.
- 4 Chen NX, Moe SM. Vascular calcification: Pathophysiology and risk factors. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 228–237
- 5 Lanzer P, Hannan FM, Lanzer JD, Janzen J, Raggi P, Furniss D, Schuchardt M, Thakker R, Fok PW, Saez-Rodriguez J, Millan A, Sato Y, Ferraresi R, Virmani R, St Hilaire C. Medial arterial calcification: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2021; 78: 1145–1165.
- 6 Montes de Oca A, Madueno JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Munoz-Castaneda J, Rodriguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. High-phosphate-induced calcification is related to SM22alpha promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 1996–2005.
- 7 Zhu D, Mackenzie NC, Millan JL, Farquharson C, MacRae VE. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2011; 6: e19595.
- 8 Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2006; 98: 905–912.
- 9 Cai T, Sun D, Duan Y, Wen P, Dai C, Yang J, He W. WNT/beta-catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic trans-differentiation and calcification through directly modulating runx2 gene expression. *Exp Cell Res* 2016; 345: 206–217.
- 10 Zhu D, Mackenzie NC, Shanahan CM, Shroff RC, Farquharson C, MacRae VE. BMP-9 regulates the osteoblastic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through an ALK1 mediated pathway. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 165–174.
- 11 Voelkl J, Luong TT, Tuffaha R, Musculus K, Auer T, Lian X, Daniel C, Zickler D, Boehme B, Sacherer M, Metzler B, Kuhl D, Gollasch M, Amann K, Muller DN, Pieske B, Lang F, Alesutan I. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF-kappaB signaling. *J Clin Invest* 2018; 128: 3024–3040.
- 12 Li ZM, Xu SW, Liu PQ. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): A golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics. *Acta Pharmacol Sin* 2018; 39: 802–824.
- 13 Wang J, Wong YK, Liao F. What has traditional chinese medicine delivered for modern medicine? *Expert Rev Mol Med* 2018; 20: e4.

- 14 Meng Z, Si CY, Teng S, Yu XH, Li HY. Tanshinone IIA inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through the TLR4/TAK1/NF- κ B signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med* 2019; 43(4): 1847–1858.
- 15 Yang L, Zou X, Liang Q, Chen H, Feng J, Yan L, Wang Z, Zhou D, Li S, Yao S, Zheng Z. Sodium tanshinone IIA sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through MEK/ERK pathway. *Exp Mol Med* 2007; 39: 65–73.
- 16 Takahashi K, Ouyang X, Komatsu K, Nakamura N, Hattori M, Baba A, Azuma J. Sodium tanshinone IIA sulfonate derived from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 745–749.
- 17 Wang N, Zhang X, Ma Z, Niu J, Ma S, Wenjie W, Chen J. Combination of tanshinone IIA and astragaloside IV attenuate atherosclerotic plaque vulnerability in ApoE^{-/-} mice by activating PI3K/AKT signaling and suppressing TLR4/NF- κ B signaling. *Biomed Pharmacother* 2020; 123: 109729.
- 18 Lou G, Hu W, Wu Z, Xu H, Yao H, Wang Y, Huang Q, Wang B, Wen L, Gong D, Chen X, Shi Y, Yang L, Xu Y, Wang Y. Tanshinone IIA attenuates vascular remodeling through klf4 mediated smooth muscle cell phenotypic switching. *Sci Rep* 2020; 10: 13858.
- 19 Qin Y, Zheng B, Yang GS, Zhou J, Yang HJ, Nie ZY, Wang TR, Zhang XH, Zhao HY, Shi JH, Wen JK. Tanshinone IIA inhibits VSMC inflammation and proliferation *in vivo* and *in vitro* by downregulating miR-712-5p expression. *Eur J Pharmacol* 2020; 880: 173140.
- 20 Jia S, Ma WD, Zhang CY, Zhang Y, Yao ZH, Quan XH, Guo X, Wang CX. Tanshinone IIA attenuates high glucose induced human VSMC proliferation and migration through miR-21-5p-mediated tropomyosin 1 downregulation. *Arch Biochem Biophys* 2019; 677: 108154.
- 21 Chen TH, Hsu YT, Chen CH, Kao SH, Lee HM. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* induces heme oxygenase-1 expression and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide expression in RAW 264.7 cells. *Mitochondrion* 2007; 7: 101–105.
- 22 Shang D, Xie Q, Ge X, Yan H, Tian J, Kuang D, Hao CM, Zhu T. Hyperphosphatemia as an independent risk factor for coronary artery calcification progression in peritoneal dialysis patients. *BMC Nephrol* 2015; 16: 107.
- 23 Drueke TB, Massy ZA. Role of vitamin D in vascular calcification: Bad guy or good guy? *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1704–1707.
- 24 Tang F, Wu X, Wang T, Wang P, Li R, Zhang H, Gao J, Chen S, Bao L, Huang H, Liu P. Tanshinone II A attenuates atherosclerotic calcification in rat model by inhibition of oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007; 46: 427–438.
- 25 Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: An early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E686–E696.
- 26 Raaz U, Schellinger IN, Chernogubova E, Warnecke C, Kayama Y, Penov K, Hennigs JK, Salomons F, Eken S, Emrich FC, Zheng WH, Adam M, Jagger A, Nakagami F, Toh R, Toyama K, Deng A, Buerke M, Maegdefessel L, Hasenfuss G, Spin JM, Tsao PS. Transcription factor Runx2 promotes aortic fibrosis and stiffness in type 2 diabetes mellitus. *Circ Res* 2015; 117: 513–524.
- 27 Nakagawa Y, Ikeda K, Akakabe Y, Koide M, Uraoka M, Yutaka KT, Kurimoto-Nakano R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1908–1915.
- 28 Voelkl J, Lang F, Eckardt KU, Amann K, Kuro OM, Pasch A, Pieske B, Alesutan I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 2077–2091.
- 29 Song Z, Feng J, Zhang Q, Deng S, Yu D, Zhang Y, Li T. Tanshinone IIA protects against cerebral ischemia reperfusion injury by regulating microglial activation and polarization via NF- κ B pathway. *Front Pharmacol* 2021; 12: 641848.
- 30 Li K, Wang X, Fan C, Wu C, Li S, Liu H. Tanshinone IIA promotes cardiac differentiation and improves cell motility by modulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Med Rep* 2020; 22: 1839–1846.
- 31 Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunol Rev* 2006; 210: 171–186.
- 32 Zhao G, Xu MJ, Zhao MM, Dai XY, Kong W, Wilson GM, Guan Y, Wang CY, Wang X. Activation of nuclear factor- κ B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosin protein homolog expression. *Kidney Int* 2012; 82: 34–44.
- 33 Gee T, Farrar E, Wang Y, Wu B, Hsu K, Zhou B, Butcher J. NF κ B (nuclear factor κ -light-chain enhancer of activated B cells) activity regulates cell-type-specific and context-specific susceptibility to calcification in the aortic valve. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40: 638–655.
- 34 Shao JS, Aly ZA, Lai CF, Cheng SL, Cai J, Huang E, Behrmann A, Towler DA. Vascular Bmp-Msx2-Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1117: 40–50.
- 35 Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005; 115: 1210–1220.