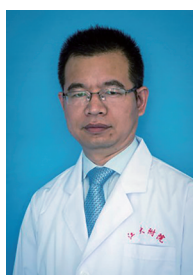


基质小泡在糖尿病足截肢患者胫前动脉斑块内钙化中的作用分析

景乐乐,王中群*

(江苏大学附属医院心内科,江苏 镇江 212001)



王中群,心血管内科学博士,江苏大学附属医院心内科副研究员,博士研究生导师,心内科实验室主任,镇江市心血管病临床医学研究中心副主任,国家自然科学基金项目评审专家。中国动脉粥样硬化专业委员会胆固醇逆向转运专家组成员,中国中药协会心血管药物研究专业委员会委员,中国脂质与脂蛋白专业委员会青年委员,江苏省中西医结合学会理事,江苏省“六大人才高峰”高层次人才,江苏省 333 人才工程中青年科学技术带头人,江苏省青年医学人才,镇江市“169 工程”学术带头人,国内外多家知名杂志特约审稿人。从事动脉粥样硬化的基础与临床研究 16 年,熟练掌握心内科常见病的诊治。先后主持国家自然科学基金面上项目 2 项、江苏省自然科学基金面上项目 1 项、江苏省卫计委项目 2 项及其他各级课题 7 项。以第一作者/通讯作者名义发表科研论文 60 余篇,参与编写专著 6 部、教材 4 本,副主编一部,授权国家发明专利 1 项,获得省市成果 2 项。每年招收心内科方向博士研究生 1 名、硕士研究生 2~3 名。

摘要: 基质小泡是多种矿物形成细胞分泌的一种膜性结构。已有研究证实,基质小泡是无定型磷酸钙结晶成核的起始位点,但基质小泡在糖尿病足截肢患者胫前动脉斑块内钙化中的具体作用如何,现有的研究尚未阐明。本实验选取 2015 年 10 月~2018 年 1 月在本院行糖尿病足截肢手术的患者共 40 例,根据组织钙定量测定将患者分为低钙化组(钙定量 <4 mol/mg, $n=20$)及高钙化组(钙定量 >4 mol/mg, $n=20$)。采用一系列形态学染色、分子生物学技术检测及统计学分析,结果显示:随着钙定量增加,基质小泡标记蛋白表达明显增加,高钙化组基质小泡水平高于低钙化组。Pearson 相关分析显示基质小泡水平与斑块内钙定量呈正相关($r=0.772\ 9$, $P<0.01$)。ROC 曲线显示曲线下面积为 0.894(95% CI:0.788~0.999, $P<0.01$)。这些结果提示基质小泡水平与糖尿病动脉斑块内钙化的演进存在正相关,其水平对不同程度斑块内钙化有一定的预测价值。

关键词: 基质小泡; 糖尿病足; 截肢; 斑块内钙化; 动脉粥样硬化

中图分类号:R54

文献标识码:A

Analysis of the role of matrix vesicles in calcification of anterior tibial artery plaque in patients with diabetic foot amputation

JING Lele, WANG Zhongqun

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu, China)

Abstract: Matrix vesicle is a membranous structure secreted by various mineral-forming cells. Studies have confirmed that matrix vesicles are the starting sites for the nucleation of amorphous calcium phosphate crystals. But the specific role of matrix vesicles in calcification of anterior tibial artery plaque in patients with diabetic foot amputation has not

收稿日期:2018-09-03;修回日期:2018-10-15

基金项目:国家自然科学基金(81770450,81370408);卫生部核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室开放课题(KF201504);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX18-0754);江苏省六大人才高峰项目(WSN-044);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016836);镇江市心血管病临床医学研究中心项目(SS2018008)。

* 通信作者, E-mail: wangtsmc@aliyun.com.

yet been fully elucidated. Forty patients with diabetic foot amputation were enrolled from October 2015 to January 2018. The patients were divided into a low calcification group (calcium quantification <4 mol/mg, $n=20$) and a high calcification group (calcium quantification >4 mol/mg, $n=20$) according to calcium quantification. A series of morphological staining, molecular biology techniques and statistical analysis were performed. The results showed that the expression of matrix vesicle marker protein increased with the increase of calcium content. The level of matrix vesicles in the high calcification group was higher than that in the low calcification group. Pearson correlation analysis showed that the level of matrix vesicles was positively correlated with the calcium content in the anterior tibial artery plaque ($r=0.772\ 9$, $P<0.01$). ROC curve showed an area under the curve of 0.894 (95% CI: 0.788-0.999, $P<0.01$). These results showed that the level of matrix vesicles is positively correlated with the progression of calcification in diabetic arterial plaques, and its level has certain predictive value for different degrees of plaque calcification.

Key words: matrix vesicles; diabetic Foot; amputation; plaque calcification; atherosclerosis

我国糖尿病患病率急剧增加,已成为全球糖尿病人数最多的国家。糖尿病严重危害人类健康^[1-2],同时为国家和个人带来了巨大的经济负担。动脉粥样硬化斑块内钙化是糖尿病的晚期并发症^[3],是动脉粥样硬化疾病进程中常见的不良事件,是心脑血管疾病致死致残的重要预测因子^[4]。因此研究斑块内钙化的发生机制对糖尿病心血管并发症的防治具有重要的理论价值及社会意义。已有的研究表明,基质小泡(matrix vesicles, MV)是血管钙化的起始位点^[5]。MV通过膜联蛋白及磷离子通道富集钙磷离子,形成最初的羟基磷灰石结晶^[6]。此后羟基磷灰石结晶作为钙盐结晶核心,继续生长形成钙化结节。但是在糖尿病斑块内钙化患者中,MV与斑块内钙盐沉积的相关性如何,MV水平能否预测糖尿病患者的钙化程度,现有的研究尚不能给出明确的答案。因此,本研究通过糖尿病足截肢患者胫前动脉标本的采集及分子生物学检测,探讨MV在斑块内钙化中的作用,为糖尿病患者斑块内钙化的防治提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2015年10月~2018年1月在江苏大学附属医院行糖尿病足截肢手术的患者共40例。根据组织钙定量测定胫前动脉钙化程度将患者分为低钙化组(钙定量 <4 mol/mg, $n=20$)及高钙化组(钙定量 >4 mol/mg, $n=20$)。所有手术均经江苏大学附属医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书及手术同意书,医务科备案。

1.2 组织钙定量测定 使用0.6 mol/L HCl溶液对烘干的动脉组织(约10 mg)进行脱钙24 h,收集上清液,使用邻甲酚酞法测量钙含量。

1.3 Vonkossa 染色 取胫前动脉石蜡切片,脱蜡脱水后按试剂盒操作说明置于2%硝酸银溶液

中,强阳光线下直射40 min后用蒸馏水冲洗3遍,吸净蒸馏水后用5%硫代硫酸钠溶液定影处理2 min,再次用蒸馏水冲洗3 min,中性品红复染3 min,经脱水、透明、封片后,于光镜下观察主动脉钙盐沉积情况。

1.4 MV的提取 将组织从 -80 ℃液氮中取出,裂解液充分裂解后放入无菌研磨器中冰上充分研磨,并静置1 h。将混合液300 g室温下离心5 min后20 000 g 4 ℃离心30 min去除组织碎片。收集上清液,并于超速离心机中100 000 g 4 ℃下离心60 min, PBS缓冲液洗涤沉淀物后同样条件下再次离心60 min。MV沉淀用PBS缓冲液稀释后放于 -20 ℃保存。

1.5 纳米粒子跟踪分析(NTA) 使用Zetaview (Particle Metrix)进行MV浓度粒径测试。其方法即纳米颗粒跟踪分析(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA),原理是对每个颗粒的布朗运动进行追踪和分析,结合Stokes-Einstein方程式计算出纳米颗粒的流体学直径和浓度。测量每个组的20个独立样本,然后显示它们的平均值。

1.6 扫描电镜 在获得样品的显微照片之前,使用临界点干燥器(PVT-3, Tousimis Semidri Rockville, MD, USA)从样品中完全蒸发水。然后在真空下用10 nm金层涂覆样品,并用SEM(SU8000和S4800, Hitachi, Tokyo, Japan)检查。

1.7 Western blot 检测 提取MV总蛋白,BCA蛋白定量并煮沸变性,8%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后,电转移(100 mA 2h)至PVDF膜上。5%脱脂牛奶 4 ℃摇床1 h后,用CD9抗体进行免疫印迹。按1:5 000比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育1.5 h后,用Western blot荧光检测试剂激发荧光,蛋白条带采用UVP凝胶图像分析系统分析,以各组目的蛋白与内参蛋白吸光度值的比值来比较待测蛋白的表达差异。

1.8 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料中正态分布用均数±标准差;非正态分布中位数±四分位数间距。两组间比较用 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料用率或百分比,组间比较用 χ^2 检验。相关分析采用 Pearson 相关性分析,MV 预测钙化的敏感性与特异性采用受试者工作曲线 (Receiver Operating Characteristic, ROC)。 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖尿病足截肢患者的基线资料 低钙化组和高钙化组糖尿病足截肢患者在男女性别比例、平均年龄、吸烟史、身体质量指数 (body mass index, BMI)、高血压比例、总胆固醇、空腹血糖 (糖尿病患者强化胰岛素治疗后)、低密度脂蛋白 (LDLC) 及高密度脂蛋白 (HDLC) 等方面比较,差异无显著性,而糖尿病病程存在显著性差异。显示糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化程度可能随患者糖尿病病程的增加而加重 (表 1)。

表 1 两组糖尿病足截肢患者的基线资料分析 (*n*=20)

项目	低钙化组	高钙化组	<i>P</i> 值
男/女 (例)	12/8	11/9	>0.99
年龄 (岁)	59±10	62±11	0.06
吸烟史 (例)	10	12	>0.75
BMI (kg/m ²)	22.71±0.20	23.34±0.27	0.21
高血压比例 (%)	42.86%	57.14%	0.53
糖尿病病程 (年)	10.6±0.72	14.45±0.55	<0.05
总胆固醇 (mmol/L)	4.54±0.13	4.96±0.17	0.22
空腹血糖 (mmol/L)	8.01±0.11	8.54±0.08	0.18
LDLC (mmol/L)	4.48±0.25	4.60±0.08	0.67
HDLC (mmol/L)	1.17±0.03	1.10±0.04	0.16

2.2 糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化情况

Vonkossa 染色结果显示两组截肢患者胫前动脉内均可见大量的动脉粥样硬化斑块,黑染的钙化灶多分布在斑块内坏死核心灶周围,尤其是斑块靠近中膜的部位;且高钙化组较低钙化组的钙化程度更重 (图 1)。

2.3 糖尿病足截肢患者扫描电镜下 MVs 特征 扫描电子显微镜 (SEM) 结果显示,低钙化组 (图 2A) 中 MV 数量较少,而高钙化组 (图 2B) 的 MV 数量多,且多呈富集状态。

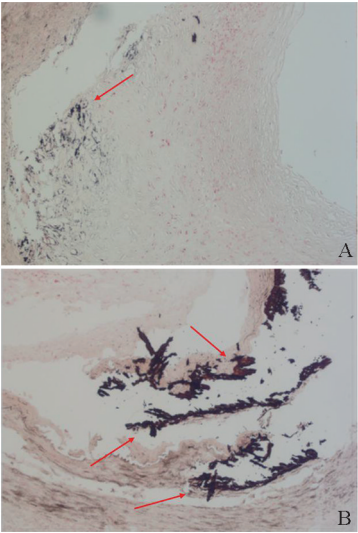


图 1 两组糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化情况
Vonkossa 染色显示胫前动脉斑块内钙盐沉积,红色箭头所指棕黑色颗粒为钙沉积区。
A:低钙化组;B:高钙化组

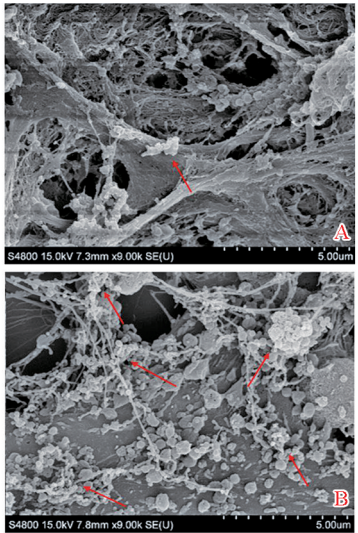


图 2 糖尿病足截肢患者扫描电镜下 MVs 特征
检测胫前动脉斑块内 MV,图中红色箭头所指区域为 MV 富集区。
A:低钙化组;B:高钙化组

2.4 糖尿病足截肢患者 MVs 标记蛋白 CD9 表达水平 Western blot 结果显示两组提取物均表达 MV 标记蛋白 CD9,提示成功提取 MV。并且相对吸光度值半定量分析显示高钙化组胫前动脉斑块内 CD9 的表达量显著高于低钙化组,约高出 2.62 倍 (0.803±0.075 vs 0.307±0.122, *P*<0.01)。结合前述结果可推测,胫前动脉斑块内的钙化程度与 MV 的量有一定关联。见图 3。

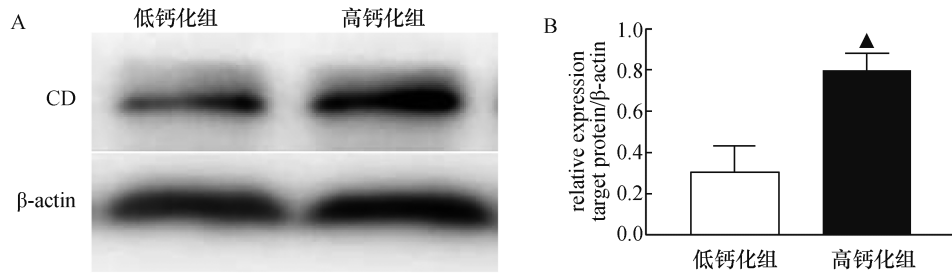


图3 糖尿病足截肢患者 MVs 标记蛋白 CD9 的表达

A: Western blot 检测低钙化组和高钙化组 MV 中 CD9 的表达量; B: 相对吸光度值半定量分析 与低钙化组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

2.5 糖尿病足截肢患者 MVs 水平与胫前动脉钙含量的相关性 钙定量测定显示高钙化组胫前动脉斑块内钙含量是低钙化组的 2.39 倍 (6.47 ± 2.24 mol/mg vs 2.71 ± 0.96 mol/mg, 表 2)。Pearson 相关性分析显示, MV 水平与胫前动脉钙含量成正相关 ($r = 0.7729$, $P < 0.01$; 图 4)。

表 2 糖尿病足截肢患者胫前动脉钙定量及 MVs 水平 ($n = 20$)

指 标	低钙化组	高钙化组
MVs (10^6 particles/mL)	29.40 ± 1.21	51.32 ± 2.52
钙含量 ($\mu\text{mol/mg}$)	2.72 ± 0.22	6.47 ± 0.51

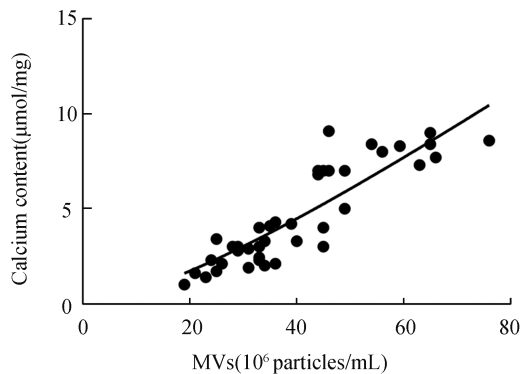


图 4 MV 水平与胫前动脉钙含量的相关性分析

2.6 糖尿病足截肢患者 MVs 对胫前动脉斑块内钙化的预测价值 ROC 曲线显示曲线下面积为 0.894 (95% CI: 0.788 ~ 0.999, $P < 0.01$)。MVs 为 41×10^6 particles/mL 时预测钙化的敏感性为 85%, 特异性为 85%, 约登指数最大为 0.7。见图 5。

3 讨 论

糖尿病动脉粥样硬化的临床终点事件包括不稳定或稳定的心绞痛、血栓形成、心脏病发作、中风和冠状动脉猝死, 斑块内钙化的存在与上述临床事件的发生密切相关^[7]。冠心病的发病率已经在不

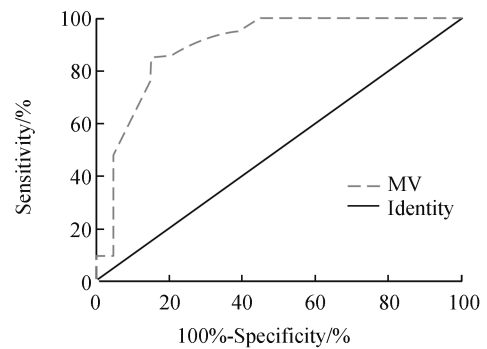


图 5 糖尿病足截肢患者 MV 对胫前动脉斑块内钙化的预测价值

断的上升, 发病人群也逐渐从老年人群转向中青年人群^[8]。已有研究证实粥样硬化斑块内钙化是心血管事件的危险标志^[7], 因此研究动脉粥样硬化斑块内钙化对动脉粥样硬化疾病的预防和治疗有重要的意义。

斑块内钙化与骨发育过程类似, 是一个细胞介导的高度调控并可逆转的主动过程^[9-10], 是动脉粥样硬化疾病进程中常见的不良事件, 是心脑血管疾病致死致残的重要预测因子^[11]。斑块内钙化是由于高钙磷环境以及局部或全身矿化诱导子上调、抑制子下调所导致的骨特异性羟基磷灰石结晶主动沉积在血管壁的病理过程^[12]。在这一过程中, 血管壁矿化防御机制被耗竭, 平滑肌细胞等间叶细胞丢失原有表型而获得成骨表型, 释放矿化脂质小泡。脂质小泡 (至少包括 MV 和凋亡小体两种形式) 为钙化结晶提供了合适的成核微环境, 而血管壁弹性蛋白则为羟基磷灰石沉积提供了支架结构^[13]。凋亡过程中从巨噬细胞和血管平滑肌细胞释放的 MV 在形成钙化过程中起关键作用。因此在成骨细胞样细胞介导的钙沉积与破骨细胞样细胞介导的钙吸收之间的平衡被打破后, 血管壁内膜、中膜或主动脉瓣膜就可能形成异位钙化^[13-14]。本研究选取糖尿病足截肢患者胫前动脉标本, 通过钙

定量检测分组后进行钙化染色,直观显示了两组标本的钙化程度。基线资料显示钙化程度可能与糖尿病病程有一定相关性。

MV 是一种位于胞外,直径 50~200 nm 的膜镶嵌微颗粒。它是来自细胞的膜性结构,起源于矿物形成细胞(软骨细胞、成骨细胞和牙质细胞)的质膜,选择性分布于软骨、骨等初始矿化位点^[12,15]。MV 被发现几乎存在于所有正常的矿化或钙化过程中,包括骨、软骨、肌腱的钙化。已有研究证实,血管平滑肌细胞、巨噬细胞等释放的 MV,是无定型磷酸钙结晶成核的起始位点^[16]。当碱性磷酸酶调控的磷酸盐浓度达到足够成核浓度时,MV 靠近膜的内表面内羟基磷灰石结晶形成并沉积于成骨胶原纤维中,通过释放到细胞外基质并与细胞外基质蛋白的相互作用启动矿化过程,随后继续生长形成钙化结节^[16-18]。

已有的研究从不同侧面阐述了糖尿病动脉粥样硬化斑块内钙化的成因及发展^[19],但在糖尿病斑块内钙化的患者中,MV 与斑块内钙化的相关性如何,以及 MV 水平能否预测糖尿病患者的钙化程度,现有的研究尚不能给出明确的答案。本研究提取糖尿病足截肢患者胫前动脉内 MV,并以 NTA 法检测 MV 水平^[20],Pearson 相关性分析显示,MV 水平与胫前动脉钙定量正相关($r = 0.7729, P < 0.01$),ROC 曲线显示曲线下面积为 0.894,提示 MV 水平用于预测胫前动脉斑块内钙化是有一定可靠性的。

本研究尚存在一定局限性。首先,本研究属于观察性研究,不能确定 MV 水平与斑块内钙化的因果关系,后期还将从动物水平及细胞水平做进一步的研究。其次,MV 的形态与 MV 内成分对斑块内钙化的形成也有一定影响,本研究由于条件限制未将上述因素纳入分析,后续实验将从以上方面进行深入研究。总之,MV 水平与糖尿病动脉斑块内钙化的演进存在正相关,其水平对不同程度斑块内钙化有一定的预测价值,这一结果可能为靶向发病机制的钙化防治策略研究带来新的切入点。

参考文献:

- [1] CURRY SJ, KRIST AH. Screening for peripheral artery disease and cardiovascular disease risk assessment with the ankle-brachial index: US preventive services task force recommendation statement[J]. JAMA, 2018,320(2):177-83.
- [2] FAIRFIELD C, PENNINGA L, POWELL J, et al. Glucocorticosteroid-free versus glucocorticosteroid-containing immunosuppression for liver transplanted patients[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2018, 4:CD007606.
- [3] KURABAYASHI M. Bone and calcium update; diagnosis and therapy of bone metabolism disease update. Calcification of atherosclerotic plaques: mechanism and clinical significance[J]. Clin Calcif

- um, 2011,21(12):43-50.
- [4] TÜRKANOGLU ÖZCELİK A, CAN DEMİRDÖĞEN B, DEMİRKAYA S, et al. Association of cytochrome P4502E1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 genetic polymorphisms with susceptibility to large artery atherosclerotic ischemic stroke: a case-control study in the Turkish population[J]. Neurol Sci, 2017,38(6):1077-85.
- [5] ZAZZERONI L, FAGGIOLI G, PASQUINELLI G. Mechanisms of arterial calcification: the role of matrix vesicles[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2018,55(3):425-32.
- [6] PASQUINELLI G, VALENTE S. Ultrastructural assessment of the differentiation potential of human multipotent mesenchymal stromal cells[J]. Ultrastruct Pathol, 2013,37(5):318-27.
- [7] 徐绥宁,李丽华,杜睿,等. Ghrelin 在糖尿病血管钙化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2016,24(9):929-33.
- [8] 唐晔,刘广辉. 冠状动脉钙化与其相关危险因素的研究进展[J]. 中南医学科学杂志,2015,43(4):473-5.
- [9] 王中群,刘乃丰. 血管钙化形成与消退机制的新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010,18(10):833-40.
- [10] WANG Z, JIANG Y, LIU N, et al. Advanced glycation end-product Nε-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2):387-96.
- [11] WANG Z, LI L, DU R, et al. CML/RAGE signal induces calcification cascade in diabetes[J]. Diabetol Metab Syndr, 2016,8:83.
- [12] BOTTINI M, MEBAREK S, ANDERSON KL, et al. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: their biogenesis, properties, functions and biomimetic models[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018,1862(3):532-46.
- [13] CHISTIakov DA, MYASOEDOVA VA, MELNICHENKO AA, et al. Calcifying matrix vesicles and atherosclerosis[J]. Biomed Res Int, 2017: 2017:7463590.
- [14] SHAPIRO IM, LANDIS WJ, RISBUD MV. Matrix vesicles: are they anchored exosomes? [J]. Bone, 2015, 79:29-36.
- [15] HUTCHESON JD, GOETTSCHE C, BERTAZZO S, et al. Genesis and growth of extracellular vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques[J]. Nat Mater, 2016,15(3):335-43.
- [16] SCHMIDT JR, KLIEMT S, PREISSLER C, et al. Osteoblast-released matrix vesicles, regulation of activity and composition by sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans[J]. Mol Cell Proteomics, 2016,15(2):558-72.
- [17] ROSZKOWSKA M, STRZELECKA-KILISZEK A, BESSUEILLE L, et al. Collagen promotes matrix vesicle-mediated mineralization by vascular smooth muscle cells[J]. J Inorg Biochem, 2018, 186:1-9.
- [18] CHEN Y, BANGASH AB, SONG J, et al. Activation of CD137 signaling accelerates vascular calcification in vivo and vitro[J]. Int J Cardiol, 2017,230:198-203.
- [19] KHARAZIHA P, CHIOUREAS D, RUTISHAUSER D, et al. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel[J]. Oncotarget, 2015,6(25):21740-54.
- [20] ZHU L, GANGADARAN P, KALIMUTHU S, et al. Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy-exosome mimetics derived from natural killer cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018,9:1-14.

(本文编辑:蒋湘莲)