

2 型糖尿病肾病大鼠肾动脉上 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的激活

覃春美, 龚财判, 魏 晓, 吴蔚桦, 刘 建, 欧三桃

(西南医科大学附属第一医院肾病内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 糖尿病肾病; 肾动脉; 骨形态蛋白 2; 信号通路

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病肾病(DN)大鼠模型肾动脉钙化及 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的激活情况。**方法** 40 只大鼠随机分为对照组和 2 型糖尿病肾病组(DN 组, STZ 加高脂高糖饮食诱导的 2 型 DN 大鼠模型), 采用钙离子试剂盒检测 8、12、16 周时肾动脉钙含量, Von Kossa 染色观察肾动脉上钙盐沉积。免疫组化检测肾动脉的 BMP2、Smad1、Runx2 及 Osterix 蛋白表达, RT-PCR 法检测肾动脉 BMP2 及 Runx2 mRNA 水平。**结果** DN 组大鼠各时间点血糖、尿素氮、胱抑素 C 及 24 h 尿白蛋白水平均较对照组明显增高($P<0.05$), 自实验 12 周后, DN 组大鼠的血肌酐值较对照组显著增高($P<0.05$)。DN 组大鼠肾动脉组织钙含量较同时点对对照组明显增加($P<0.05$), Von Kossa 染色见对照组大鼠各时间点均无明显钙盐沉积, 而 DN 组大鼠肾动脉自第 8 周时即有黑色颗粒沉积, 随着时间的延长沉积的黑色钙盐逐渐增多并聚集成团。与对照组相比, DN 组大鼠肾动脉组织中 BMP2 及其下游因子的表达明显升高, 同时 BMP2、Runx2 mRNA 水平亦增加。相关性分析表明, 肾动脉钙含量与 BMP2、Runx2 mRNA 均呈显著正相关($r=0.641$, $r=0.683$, 均 $P<0.01$)。**结论** 2 型糖尿病肾病模型大鼠肾动脉早期即可出现血管钙化, 且 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路激活在其中起重要调节作用。

[中图分类号] R446.69

[文献标识码] A

Activation of BMP2/Smad1/Runx2/Osterix Signal Pathway in Renal Artery of Type 2 Diabetic Nephropathy Rats

QIN Chun-Mei, GONG Cai-Pan, WEI Xiao, WU Wei-Hua, LIU Jian, and OU San-Tao

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Diabetic Nephropathy; Renal Artery; Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2); Signal Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore the calcification of renal artery and the activation of BMP2/Smad1/Runx2/Osterix signal pathway in type 2 diabetic nephropathy rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into control group and diabetic nephropathy group (DN group). Type 2 diabetic nephropathy model was established by high sugar and fat diet and streptozotocin (STZ) injection. The calcium content were detected by calcium assay kit in 8, 12 and 16 weeks. Calcium depositing in the renal artery was observed by Von Kossa staining. The protein expression of BMP2, Smad1, Runx2 and Osterix were detected with immunohistochemistry. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were applied to detect the gene expression levels of BMP2 and Runx2 in the renal artery. **Results** Contents of blood glucose, blood urea nitrogen (BUN), cystatin C (CysC) and 24 h urinary albumin (24 h UA) of DN group at all time point were much higher than those of control group ($P<0.05$). Serum creatinine (SCr) of DN group was higher than that of control group since 12th week ($P<0.05$). The calcium content in DN group were significantly higher than those in control group at each time point ($P<0.05$). Black granules were found deposited in the renal artery of DN rats in 8 weeks and the black calcium salt was gradually increased with the time passing. No calcium salt was found in control group. Compared with the control group, the protein expression of BMP2/Smad1/Runx2/Osterix signal pathway and the expression of BMP2, Runx2 mRNA in DN group rats were significantly higher. Correlation analysis demonstrated that calcium content was positively correlated with BMP2, Runx2 mRNA ($r=0.641$, $r=0.683$, all $P<0.01$). **Conclusion** The renal artery calcification

[收稿日期] 2015-10-23

[修回日期] 2016-05-13

[作者简介] 覃春美, 硕士研究生, 医师, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化, E-mail 为 269386723@qq.com。欧三桃, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化。吴蔚桦, 博士, 主治医师, 讲师, 研究方向为糖尿病肾病。

may appear in the early stages of type 2 diabetic nephropathy rats model and the activation of BMP2/Smad1/Runx2/Osterix signal pathway may be an important regulating factor in the renal artery calcification.

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病的主要并发症,已成为我国终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的第二位原因,上升为美国、日本及许多西欧国家接受透析和肾移植患者的首位病因。在 DN 患者死亡原因中,心血管并发症占首要地位,而血管钙化则是 DN 患者心血管并发症的主要表现之一,也是 DN 患者心血管死亡的主要危险因素^[1]。近年有研究表明, DN 患者早期即可发生血管钙化,而 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的活化与钙化的发生发展紧密相关。因此本研究采用高脂高糖联合 STZ 诱导的 2 型 DN 大鼠模型,观察其肾动脉的钙化情况及探讨 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的激活及表达情况。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 170~220 g[四川医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(川 2013-065)]。

1.1.2 主要试剂 STZ(Sigma 公司);血糖试纸(美国强生);生物素化羊抗兔 IgG(美国 Carlsbad 公司);BMP2 多克隆抗体和 Runx2 抗体(北京博奥森);即用型 ABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);钙离子检测试剂盒(南京建成生物有限公司);PrimeScriptTM RT Master Mix、SYBR Premix Ex TaqTM II(大连宝生物公司)。

1.1.3 引物合成 引物由上海生物工程有限公司合成。BMP2 引物为上游 5'-CAGCGAGTTTGAGT-TGAGG-3',下游 5'-CGGTACAGGTTCGAGCATAT-3',产物长度 104 bp;Runx2 引物为上游 5'-CCCAACT-TCCTGTGCTCC-3',下游 5'-AGTGAACTCTTGCTCTCGTC-3',产物长度 240 bp;GAPDH 引物为上游 5'-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3',下游 5'-CCATC-CACAGTCTTCTGAGT-3',产物长度 140 bp。

1.2 2 型糖尿病肾病模型制备及分组

40 只 SD 雄性大鼠,适应性喂养 1 周后随机分为对照组($n=18$)和糖尿病肾病组(DN 组, $n=22$)。DN 组以高糖高脂饲料喂养 4 周后,予 STZ 35 mg/kg 一次性腹腔注射,对照组以基础饲料喂养,腹腔注射等量枸橼酸盐缓冲液。72 h 后测随机血糖,以连续 3 次血糖 ≥ 16.7 mmol/L、24 h 尿量大于造模前

50%及 24 h 尿蛋白排泄大于 30 mg 为 DN 模型制备成功。实验第 8、12、16 周时处死大鼠,留取 24 h 尿液并心脏取血,用全自动生化分析仪检测大鼠血糖、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)、胱抑素 C(cystatin C, CysC)及 24 h 尿白蛋白(24 hour urinary albumin, 24 h UA)值。摘取肾动脉标本,左侧肾动脉组织固定于 4% 中性多聚甲醛液,经脱水、透明和包埋,制成石蜡块,其余组织冻存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.3 大鼠肾动脉钙含量测定

取大鼠肾动脉,用滤纸吸干称重,加入 2 mol/L 的硝酸并于 180℃ 消化及烤干,冷却后加入含氯化钾及氯化钨的去离子水复溶,再加入氯化铯后用原子吸收分光光度计测定光密度值。

1.4 Von Kossa 染色

取大鼠肾动脉石蜡块,制作为 4 μ m 厚的石蜡切片,常规脱蜡、脱水,浸入 1% 的硝酸银溶液,紫外灯照射 20 min 后将切片置入 5% 硫代硫酸钠液 1 min,经苏木精伊红复染、脱水、透明、封片,行光镜观察钙盐沉积的情况。

1.5 免疫组化观察 BMP2、Smad1、Runx2 及 Osterix 蛋白表达

大鼠肾动脉石蜡切片脱蜡至水后,按免疫组化试剂盒的说明,采用 ABC 法依次行热修复抗原,正常山羊血清封闭非特异抗原,滴加一抗、二抗、ABC 复合物、DAB 显色液,苏木素复染,常规脱水、透明、中性树脂胶封片,出现棕黄色颗粒为阳性信号。

1.6 RT-PCR 法检测肾动脉中 BMP2 及 Runx2 mRNA 水平

肾动脉组织总 RNA 的提取,按试剂盒说明进行,再用逆转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。荧光定量 PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 30 s,40 个循环内 95℃ 变性 5 s,58℃ 退火 34 s。实时记录 cDNA 的扩增,并在仪器默认条件下分析。内参 GAPDH 与目的基因在同一条件下反应。通过 StepOne 软件分析,依据 PCR 反应的 CT 值,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.7 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,组间的比较采独立样本 t 检验,相关性分析用 Pearson 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生化指标变化

DN 组大鼠各时间点血糖、BUN、CysC 及 24 h

UA 水平均较对照组显著升高($P<0.05$)。自实验 12 周起, DN 组大鼠的血 SCr 值较对照组明显增高($P<0.05$;表 1)。

表 1. 大鼠各时间点血糖及肾功能指标变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1. Changes of blood glucose and renal function indices in rats at different time points($\bar{x}\pm s$)

项 目	对照组			DN 组		
	8 周	12 周	16 周	8 周	12 周	16 周
血糖(mmol/L)	8.16±3.89	8.76±2.50	7.86±1.40	28.94±3.72 ^a	26.48±3.32 ^a	26.19±3.57 ^a
BUN(mmol/L)	6.09±0.30	5.46±0.79	5.63±0.47	7.65±0.87 ^a	7.98±0.82 ^a	8.46±1.43 ^a
SCr(μmol/L)	48.83±8.28	46.00±4.86	36.17±3.49	49.67±9.29	68.50±7.18 ^a	74.33±12.37 ^a
CysC(mg/L)	0.36±0.07	0.32±0.10	0.21±0.01	0.55±0.01 ^a	0.58±0.09 ^a	0.67±0.11 ^a
24 h UA(mg)	16.35±1.80	22.93±2.72	21.35±2.72	102.70±16 ^a	115.36±15.7 ^a	124.88±14.27 ^a

a 为 $P<0.05$, 与对照组同时间点比较。

2.2 肾动脉钙含量测定

钙含量测定结果显示, 随实验时间的延长, 两组大鼠钙含量逐渐增加, 且各时间点 DN 组大鼠肾动脉组织钙水平较对照组均显著升高($P<0.05$;表 2)。

表 2. 两组大鼠肾动脉组织钙含量($\bar{x}\pm s$, μmol/g)

Table 2. The calcium content in renal artery of two group rats($\bar{x}\pm s$, μmol/g)

时间	对照组	DN 组
8 周	6.26±1.77	28.44±6.05 ^a
12 周	6.29±1.82	33.72±7.35 ^a
16 周	6.68±1.94	38.86±7.72 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与对照组同时间点比较; b 为 $P<0.05$, 与 DN 组 8 周比较。

2.3 肾动脉 Von Kossa 染色结果

实验 8 周时, DN 组肾动脉组织内膜及中膜弹性纤维间可见黑色颗粒沉积, 表明存在钙盐沉积, 且随时间的推移, 沉积的黑色颗粒逐渐增多, 于实验 16 周时可见钙盐颗粒聚集成团。对照组各时间点均未见明显钙盐沉积(图 1)。

2.4 肾动脉组织 BMP2、Smad1、Runx2 及 Osterix 蛋白表达

免疫组化结果显示, 造模成功后 8 至 16 周, 对照组大鼠肾动脉血管中膜平滑肌细胞可见 BMP2、Smad1、Runx2 及 Osterix 在各时间点均仅有少量表达; 而 DN 组大鼠可见 BMP2、Smad1、Runx2 及 Osterix 蛋白大量表达, 阳性着色深, 且随着时间的延长, 各蛋白的表达均逐渐增多(图 2~图 5)。

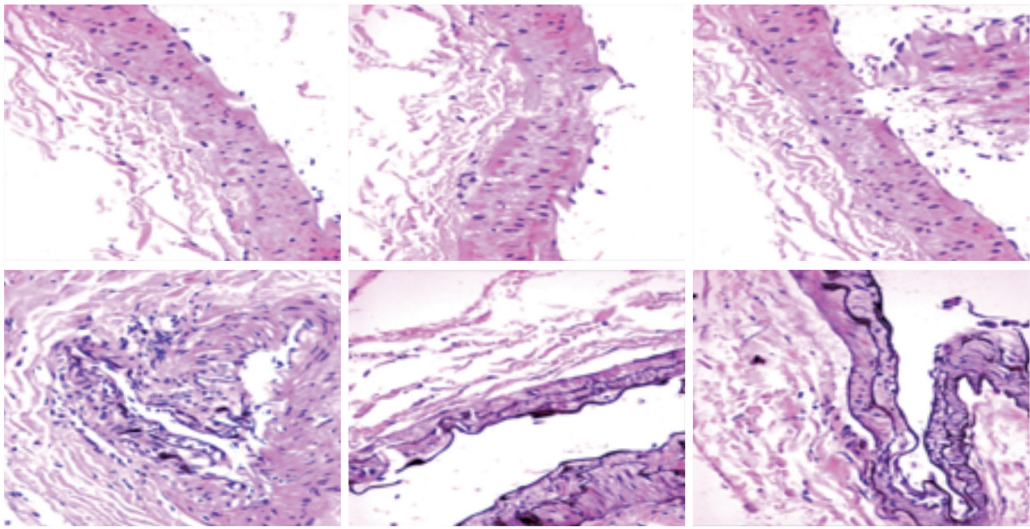


图 1. 大鼠肾动脉 Von Kossa 染色情况(200×) 上图为对照组, 下图为 DN 组; 从左至右依次为实验 8 周、12 周和 16 周。

Figure 1. Von Kossa staining of the renal artery in rats(200×)

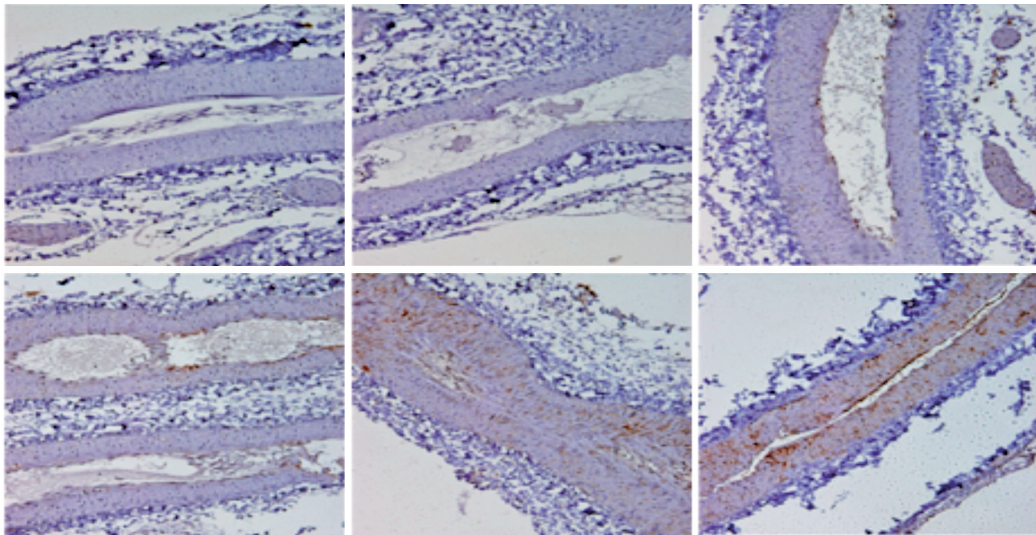


图 2. 免疫组化检测不同时间点 BMP2 的表达 (200×) 上图为对照组, 下图为 DN 组; 从左至右依次为实验 8 周、12 周和 16 周。

Figure 2. Expression of BMP2 protein at different time points detected by IH (200×)

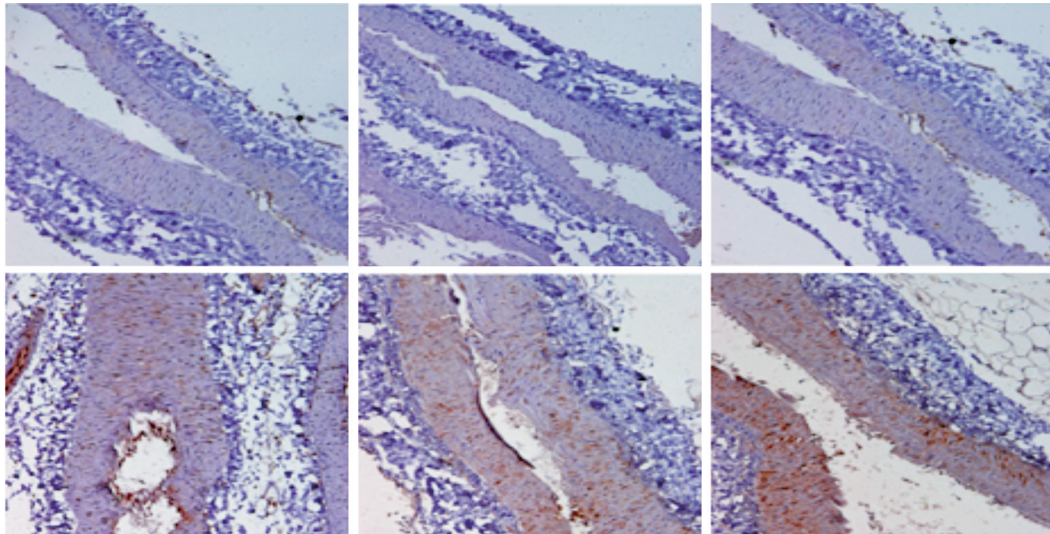


图 3. 免疫组化检测不同时间点 Smad1 的表达 (200×) 上图为对照组, 下图为 DN 组; 从左至右依次为实验 8 周、12 周和 16 周。

Figure 3. Expression of Smad1 protein at different time points detected by IH (200×)

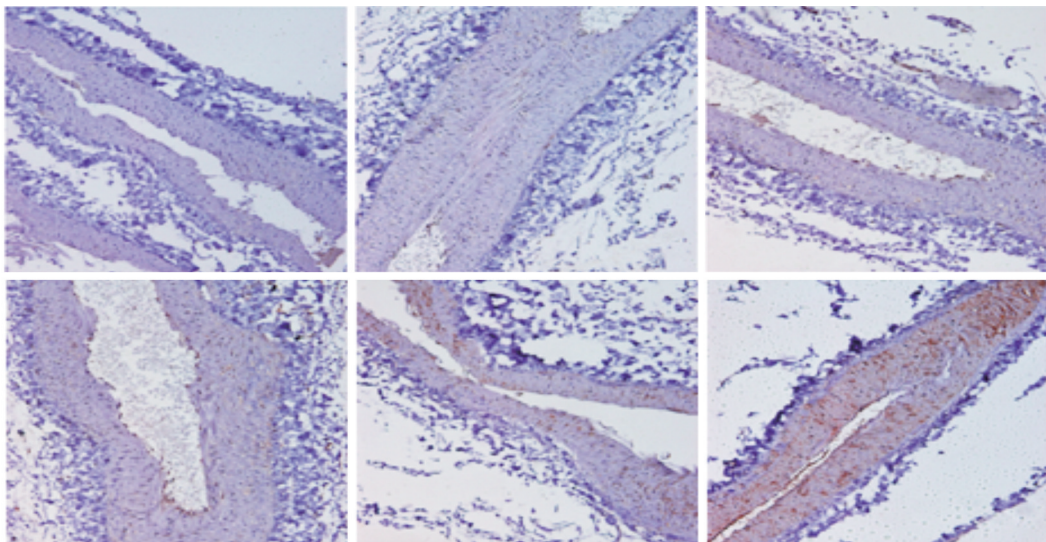


图 4. 免疫组化检测不同时间点 Runx2 的表达 (200×) 上图为对照组, 下图为 DN 组; 从左至右依次为实验 8 周、12 周和 16 周。

Figure 4. Expression of Runx2 protein at different time points detected by IH (200×)

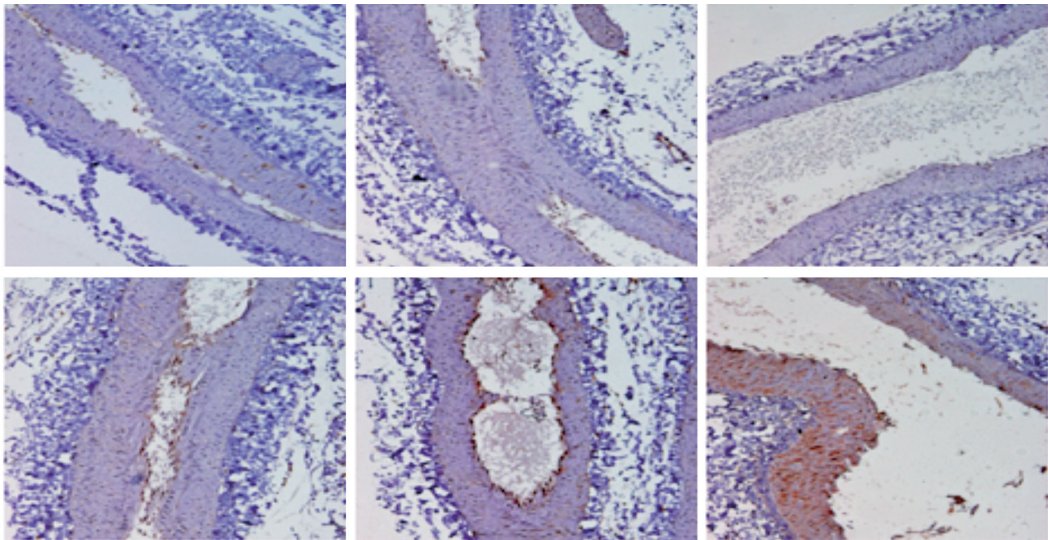


图 5. 免疫组化检测不同时间点 Osterix 的表达(200×) 上图为对照组,下图为 DN 组;从左至右依次为实验 8 周、12 周和 16 周。
Figure 5. Expression of Osterix protein at different time points detected by IH(200×)

2.5 BMP2 和 Runx2 mRNA 表达水平

RT-PCR 结果示, 对照组大鼠肾动脉组织 BMP2、Runx2 mRNA 仅有微量表达,且各时间点无统计学差异。自实验 8 周起,DN 组大鼠肾动脉组织 BMP2 和 Runx2 mRNA 水平开始增加,16 周时 BMP2 及 Runx2 mRNA 的表达量达最高值($P<0.05$;表 3)。

表 3. 两组大鼠肾动脉 BMP2、Runx2 mRNA 表达量($\bar{x}\pm s$)
Table 3. The expression of BMP2, Runx2 mRNA in renal artery of two group rats($\bar{x}\pm s$)

时间	BMP2		Runx2	
	对照组	DN 组	对照组	DN 组
8 周	0.94±0.20	1.18±0.16 ^a	1.08±0.13	1.41±0.34 ^a
12 周	0.98±0.21	1.27±0.18 ^a	1.16±0.18	1.71±0.40 ^a
16 周	0.98±0.21	1.43±0.19 ^{ab}	1.07±0.17	2.02±0.48 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与对照组同时点比较;b 为 $P<0.05$,与 DN 组 8 周比较。

2.6 相关性分析

相关分析结果表明,大鼠肾动脉组织钙含量与 BMP2、Runx2 mRNA 表达量呈显著正相关($r = 0.641, r = 0.683$,均 $P<0.01$;图 6 和图 7)。

3 讨 论

DN 作为糖尿病的主要慢性并发症之一,已成为我国 ESRD 的第二位病因^[2]。既往研究表明糖尿病可加速血管钙化的发生发展,糖尿病患者发生动

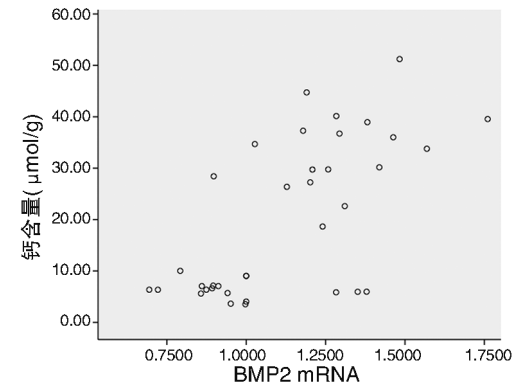


图 6. 大鼠 BMP2 mRNA 和钙含量值的相关性散点图
Figure 6. The scatter diagram of rat BMP2 mRNA and calcium content value

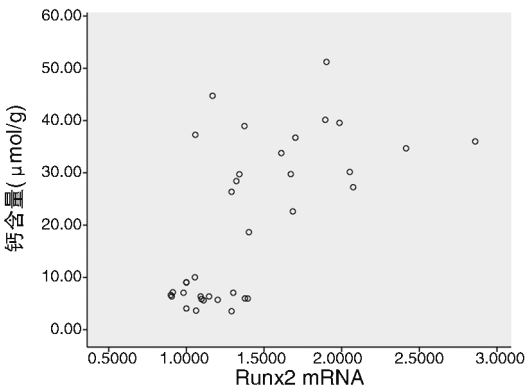


图 7. 大鼠 Runx2 mRNA 和钙含量值的相关性散点图
Figure 7. The scatter diagram of rat Runx2 mRNA and calcium content value

脉钙化指数显著高于非糖尿病患者^[3-4]。慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)患者由于广泛的慢

性炎症反应以及钙磷代谢紊乱促进矿物质在血管壁的沉积,也可促进血管钙化。而 DN 患者在糖尿病及 CKD 的双重促血管钙化因素作用下,其血管钙化的发生率及钙化程度也显著超过无 CKD 的糖尿病患者和非 DN 的 CKD 患者, DN 早期即可发生血管钙化^[5-6]。我们前期研究发现在 STZ 诱导的 DN 大鼠模型中,肾实质内小动脉在 DN 早期即存在血管钙化,并出现了早期血管钙化标志 BMP2、Runx2、骨钙素、骨保护素等的表达^[7]。Chiu 等^[8]用多元螺旋 CT 检测糖尿病伴蛋白尿患者肾动脉钙化情况,表明 DN 患者早期无明显临床症状时即存在较明显的肾动脉钙化,肾动脉钙化可能参与和促进了 DN 的发生发展。然而,由于研究方法的限制,有关 DN 动物模型的肾动脉钙化情况及 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的激活和表达情况还鲜有研究。

本研究用 STZ 加高脂高糖饮食诱导 2 型 DN 大鼠模型观察 DN 肾动脉情况,研究结果显示 DN 组各时间点血糖及 24 h 尿白蛋白水平明显高于对照组,造模成功;实验 8 周时, DN 模型大鼠肾动脉组织钙含量显著高于对照组,肾动脉组织 Von Kossa 染色见黑色钙盐沉积,而正常大鼠无沉积,表明 DN 在较早阶段时即已存在肾动脉等大动脉的钙化。

BMP2 信号通路是成骨分化过程中的重要调控通路之一^[9]。BMP2 受体包括 I 型和 II 型受体,当细胞外的 BMP2 配体与细胞表面 II 型受体结合时,可磷酸化 I 型受体,活化的 I 型受体磷酸化并激活下游的 Smad1/Smad5/Smad8,活化的 Smad1、Smad5、Smad8 与 Smad4 结合形成复合体后,可转位进入细胞核内并上调 Runx2、Osterix 和同源盒基因等基因,从而促进成骨分化^[10]。血管钙化是一个受到多因素调控的、发生机制尚不十分清楚的、与骨矿化作用相似的积极主动调节过程^[11]。有研究表明,糖尿病所致的血管钙化与 BMP 信号通路的活化密切相关。Boström 等^[12]发现,高糖可导致人主动脉内皮细胞 BMP2、BMP4 及 ALK1、ALK2、ALK3、ALK4 的表达上调,血管内皮细胞内钙盐的沉积增加;高血糖水平可以通过活化 BMP2 信号通路从而促进血管钙化,而这一过程可以被 BMP 的抑制剂干扰逆转。Miller 等^[13]用高脂高糖饲料喂养小鼠,发现 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的活化与小鼠主动脉瓣膜钙化有密切联系。本研究通过诱导 DN 大鼠模型发现, BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路相关蛋白及基因在正常大鼠肾动脉组织中均仅有极少量表达,而在 DN 模型大鼠肾动脉组织

中,随着病程的进展 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路相关蛋白及基因的表达越来越强,钙盐的沉积亦越来越明显、钙化越来越重,表明 DN 肾动脉出现明显钙化前就已存在 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 通路的明显激活, BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的活化可能促进了血管钙化的发生发展。

综上, DN 在较早阶段时即已存在肾动脉等大动脉的钙化,而在钙化血管中存在 BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路的激活, BMP2/Smad1/Runx2/Osterix 信号通路可能是 DN 肾动脉血管钙化重要的调节因素,阻断该通路有望成为防治糖尿病血管钙化的治疗靶点,从而为 DN 的防治提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Patel T, Charytan DM. Cardiovascular complications in diabetic kidney disease[J]. *Semin Dial*, 2010, 23: 169-177.
- [2] 张路霞, 王海燕. 从流行病学的角度探讨我国糖尿病肾病的发病趋势及对策[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(9): 804-805.
- [3] Farrag A, Bakhoun S, Salem MA, et al. The association between extracoronary calcification and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Heart Vessels*, 2013, 28: 12-18.
- [4] Liu F, Zhong H, Liang JY, et al. Effect of high glucose levels on the calcification of vascular smooth muscle cells by inducing osteoblastic differentiation and intracellular calcium deposition via BMP-2/Cbfa-1 pathway[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(12): 905-911.
- [5] Garland JS, Holden RM, Hopman WM, et al. Body mass index, coronary artery calcification and kidney function decline in stage 3 to 5 chronic kidney disease patients[J]. *J Ren Nutr*, 2013, 23(1): 4-11.
- [6] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease[J]. *Circulation*, 2008, 117: 2 938-948.
- [7] 欧三桃, 黄颂敏, 赵安菊, 等. 糖尿病肾病大鼠肾实质内小动脉钙化及其与骨基质蛋白的关系[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(11): 957-960.
- [8] Chiu YW, Adler S, Budoff M, et al. Prevalence and prognostic significance of renal artery calcification in patients with diabetes and proteinuria[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5(11): 2 093-100.
- [9] Lowery JW, Pazin D, Intini G, et al. The role of BMP2 signaling in the skeleton[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*, 2011, 21(2): 177-185.
- [10] Chen J, Shi ZD, Ji X, et al. Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(5-6): 716-728.
- [11] Valdivielso JM. Vascular calcification: types and mechanisms [J]. *Nefrologia*, 2011, 31(2): 142-147.
- [12] Boström KI, Jumabay M, Matveyenko A, et al. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus[J]. *Circ Res*, 2011, 108(4): 446-457.
- [13] Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, et al. Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2 482-486.

(此文编辑 许雪梅)