

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.12.009

抑制 DBP 对慢性尿毒症大鼠血管钙化的影响

欢迎扫码观看
文章视频简介

曹素娟 刘书政 袁步奇 袁培乐 赵松鹤 张云芳

【摘要】 目的 探讨转录因子 D 位点结合蛋白 (DBP) 基因修饰对慢性尿毒症大鼠血管钙化的影响。方法 从基因表达综合数据库 (GEO) 下载表达谱数据 GSE146638, 共纳入 10 只大鼠样本的 mRNA 表达谱, 采用 DESeq2 差异表达分析数据库中正常对照组和慢性尿毒症组大鼠主动脉血管平滑肌的差异表达基因, 记录逆转录-实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测的上调基因糖转运蛋白基因 SLC22A2、转录激活因子 3 (ATF3)、DBP、鞘磷脂磷酸二酯酶 3 (SMPD3) 的表达水平。另选择 24 只雄性 SD 大鼠分为 4 组, 空白组不做任何处理; 模型组切除 2/3 左肾和右肾诱导慢性尿毒症模型, 存活大鼠喂饲高磷饲料 8 周诱导血管钙化; 慢病毒对照组 (shNC 组) 在建立慢性尿毒症大鼠血管钙化模型后注射对照慢病毒治疗 4 周; 小干扰 DBP (siDBP) 慢病毒实验组 (shDBP 组) 在建立慢性尿毒症大鼠血管钙化模型后注射 siDBP 慢病毒治疗 4 周。干预后测量 4 组大鼠的体质量, 检测 4 组大鼠的血清肌酐、血钙、血磷和尿液尿素氮水平, 并用胸主动脉组织 HE 染色和免疫组织化学染色评估模型的损伤程度; 应用 RT-qPCR 和蛋白免疫印迹法检测大鼠主动脉中 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 以及 DBP 的相对表达量。结果 与空白组比较, 模型组、shNC 组和 shDBP 组大鼠的体质量较低, 血清肌酐水平较高 (P 均 < 0.05); 模型组大鼠胸主动脉血管壁变厚、RUNX2 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达上调; 与模型组比较, shDBP 组大鼠血清肌酐水平下降、胸主动脉 RUNX2 mRNA 和蛋白表达均降低 (P 均 < 0.05), 胸主动脉 PCNA 表达减弱, 胸主动脉壁增厚程度减轻。结论 下调主动脉血管中的 RUNX2 mRNA 和蛋白表达抑制 DBP 表达, 可能减轻慢性尿毒症大鼠血管钙化程度和尿毒症相关症状。

【关键词】 慢性尿毒症; 血管钙化; D 位点结合蛋白; Runt 相关转录因子 2

Effect of DBP inhibition on vascular calcification in chronic uremic rats Cao Sujuan[△], Liu Shuzheng, Yuan Buqi, Yuan Peile, Zhao Songhe, Zhang Yunfang. [△]Department of Thyroid Surgery, Huadu District People's Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510800, China

Corresponding author, Liu Shuzheng, E-mail: lsz5205@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of D-site binding protein (DBP) inhibition on vascular calcification in chronic uremic rats. **Methods** GSE146638 was downloaded from the public database (Gene Expression Omnibus, GEO), and a total of 10 samples from rat of mRNA expression profiles were included in this study. DESeq2 was used to analyze the differentially expressed genes in the aortic smooth muscle between the control and chronic uremic rat model groups. RT-qPCR was employed to detect the expression levels of SLC22A2, ATF3, DBP and SMPD3. Male SD rats were randomly divided into four groups. In the blank group, no treatment was given. In the model group, chronic uremic rat models were established by nephrectomy of 2/3 of bilateral kidneys, and the surviving rats were fed with 8-week high phosphorus diet to induce vascular calcification. In the negative control lentivirus group (shNC group), the rats were injected with negative control lentivirus for 4 weeks after establishing the vascular calcification uremic rat models. In the small interfering DBP group (shDBP group), the rats were treated with siDBP lentivirus for 4 weeks after the establishment of vascular calcification uremic rat models. After corresponding interventions, the rat weight was measured, and serum creatinine, serum phosphorus, serum calcium and urea nitrogen levels were detected among four groups. Immunohistochemical staining and HE staining of the thoracic aorta tissues were used to evaluate the degree of injury. RT-qPCR and western blot were adopted to quantitatively measure the relative expression levels of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and DBP. **Results** Compared with the control group, the rat weight was significantly less, whereas the serum creatinine levels were significantly higher in the model,

基金项目: 广州市科学技术局基础与应用基础研究项目 (202002030285)

作者单位: 510800 广州, 南方医科大学附属花都医院 广州市花都区人民医院甲状腺外科 (曹素娟, 刘书政, 袁步奇, 赵松鹤), 肾内科 (张云芳)

通信作者, 刘书政, E-mail: lsz5205@126.com

shNC and shDBP groups (all $P < 0.05$). In the model group, the thoracic aortic vascular wall was thickened, and the expression levels of RUNX2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were up-regulated. Compared with the model group, the serum creatinine level was declined, the expression levels of RUNX2 mRNA and protein in the thoracic aorta were down-regulated (all $P < 0.05$), the expression level of PCNA in the thoracic aorta was down-regulated and the thoracic aortic vascular wall thickening was mitigated.

Conclusion Inhibition of DBP may suppress vascular calcification and alleviate uremia-associated symptoms in chronic uremic rat models by down-regulating the expression levels of RUNX2 mRNA and protein in the aorta.

【Key words】 Chronic uremia; Vascular calcification; D-site binding protein; Runt-related transcription factor 2

血管钙化是慢性尿毒症患者发病和死亡的高危因素^[1]。组织学上,血管钙化分为2种类型,一种是与动脉粥样硬化相关的内膜钙化,表现为富含脂质的巨噬细胞浸润的内膜增生;另一种是中膜钙化,钙磷酸盐沉积于动脉中膜的平滑肌层,主要见于代谢相关疾病,如慢性尿毒症和糖尿病^[23]。多项研究表明在慢性肾脏病患者中,高钙血症、甲状旁腺激素水平升高、炎症细胞因子、氧化应激、高磷血症等因素参与血管钙化^[48]。近年研究表明,血管钙化是主动的、细胞介导调控的生物学进程,与软骨和骨形成类似,表现为血管平滑肌细胞伴随骨形成相关蛋白[Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨形态发生蛋白(BMP2)]的上调表达^[9-10]。转录因子D位点结合蛋白(DBP)属于脯氨酸和酸性氨基酸含量丰富的碱性亮氨酸拉链(PAR bZIP)转录因子家族成员,可结合靶基因启动子区特异的序列并激活转录调控生物昼夜节律^[11]。DBP是否参与尿毒症的调控尚未阐明,因此本研究对尿毒症血管钙化模型大鼠尾静脉注射小干扰DBP(shDBP)慢病毒,研究DBP在抑制尿毒症血管钙化模型的作用及潜在机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物

24只清洁级Sprague-Dawley雄性大鼠,8周龄,体质量180~220g,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物的使用和处理过程均符合动物实验相关伦理规范。

2. 主要试剂和仪器

限制性内切酶AgeI、EcoRI购于纽英伦生物技术(北京)有限公司;RUNX2、 β -actin抗体购于美国CST中国公司。德国Eppendorf 5920 R高速低温离心机,中国粤显XJL-20/XJL-20BD普通光学显微镜,美国Thermo HR1500-II生物安全柜,美

国伯乐小型水平电泳槽,海尔HCB-1300V超净工作台。

3. 短发夹RNA(shRNA)设计和构建

参照已知GenBank所示DBP mRNA序列以及shRNA的设计要求,设计并合成靶向DBP的特异性shRNA(shDBP)序列:正向5'-CCGGGAAGCCTCAGCCAATCATGAACTCGAGTTCATGATTGGCTGAGGCTT-3',反向5'-AATTCAAAAGAAGCCTCAGCCAATCATGAACTCGAGTTCATGATTGGCTGAGGCTT-3',同时设计相应的阴性对照shRNA(shNC)序列:正向5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向5'-ACGUGACACGUUCGAGAATT-3'。shDBP和shNC序列由广州辉园医药科技有限公司设计、合成,并重组到pLKOG-shRNA质粒,对应质粒的名称为pLKOG-shDBP和pLKOG-shNC。

二、方法

1. shDBP和shNC慢病毒包装及病毒滴度检测

将处于对数生长期的293T细胞接种到细胞培养皿,待细胞密度达到约80%时将pLKOG-shDBP和pLKOG-shNC分别与慢病毒包装质粒共转染到293T细胞,分别在24、48h转染换液时收集细胞培养上清,通过低温超速离心浓缩假病毒颗粒,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬的慢病毒浓缩液根据Lentivirus Titration Kit(TaKaRa)操作手册检测病毒滴度。

2. 模型制备

选取24只雄性SD大鼠按数字表法分为4组,每组各6只。根据参考文献^[12]采用两步法切除肾脏:选取18只大鼠予5%戊巴比妥钠(1mL/kg)腹腔注射麻醉,切除大鼠2/3左肾,并于4d后全切除大鼠右肾,术后1周存活的大鼠喂饲高磷饲料(含0.9%钙、1.2%磷,购于江西协同生物工程有限责任公司)诱导血管钙化模型^[13]。模型组:慢性尿毒症血管钙化模型大鼠喂饲高磷饲料8周后,

予尾静脉注射生理盐水4周。慢病毒对照组 (shNC组): 慢性尿毒症血管钙化模型大鼠喂饲高磷饲料8周后, 予尾静脉注射对照慢病毒4周。抑制 DBP 慢病毒组 (shDBP 组): 慢性尿毒症血管钙化模型大鼠喂饲高磷饲料8周后, 给予抑制 DBP 慢病毒尾静脉注射4周。余下喂饲标准饲料的6只大鼠为空白组。治疗4周后, 测量4组大鼠的体质量, 并收集4组大鼠的颈静脉血、尿液、胸主动脉组织样本用于后续的指标检测, 每个指标检测至少3个生物学重复。

3. 生化指标检测

取大鼠颈静脉血离心分离血清, 采用山东博科生物产业有限公司全自动生化分析仪及配套试剂检测其血清肌酐、血钙、血磷及尿液尿素氮水平。

4. 大鼠胸主动脉血管组织 DBP 和 RUNX2 的 mRNA 表达检测

采用逆转录-实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测。根据 RNA 提取试剂盒说明书提取4组大鼠胸主动脉血管组织总 RNA, 逆转录为模板 DNA, 进行 RT-qPCR 检测。所需引物由广州艾基生物技术有限公司合成 (表1), 以 β -actin 为内参对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 DBP 和 RUNX2 的 mRNA 表达水平。

5. 大鼠胸主动脉血管组织 RUNX2 蛋白表达检测

用 RIPA 裂解液处理4组大鼠的胸主动脉血管组织, 蛋白定量后取 10 μ g 总蛋白进行电泳分离并转移至 PVDF 膜。加入 RUNX2 抗体 (1:1000)、 β -actin 抗体 (1:1000) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 用 Image J 软件分析条带的灰度值。

6. 大鼠胸主动脉血管组织病理学检测

免疫组织化学 (免疫组化) 染色: 取4组大鼠的胸主动脉血管组织制作石蜡切片后行抗原修复, 加入增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体 (1:1000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 37 $^{\circ}$ C 孵育二抗 2 h, 3,3'-二氨基

联苯胺四盐酸盐 (DAB) 显色。HE 染色: 取4组大鼠的胸主动脉血管组织制作石蜡切片后行 HE 染色, 光镜下观察血管病理学变化。

7. 数据来源及预处理

本研究所用的测序数据来源于基因表达综合数据库 (GEO)。慢性尿毒症大鼠的主动脉血管平滑肌 mRNA 表达数据来源于 GSE146638^[14]。对所筛选的慢性尿毒症大鼠 (慢性尿毒症组) 与对照组大鼠主动脉血管平滑肌中差异表达的基因, 分别进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 分析。

三、统计学处理

采用 SPSS 22.0 分析数据。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。非正态分布的计量资料采用 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 符号秩检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、GEO 分析结果

选取数据集 GSE146638 中的 5 只慢性尿毒症大鼠 (慢性尿毒症组) 和 5 只正常对照大鼠 (对照组) 的主动脉血管平滑肌组织 mRNA 表达数据, 结果显示有 86 个基因上调、335 个基因下调, 差异表达基因主要富集在 MAPK 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路。根据分析结果, 选取差异表达基因糖转运蛋白基因 SLC22A2、转录激活因子 3 (ATF3)、DBP、鞘磷脂磷酸二酯酶 3 (SMPD3) 为候选基因。RT-qPCR 法检测结果分析显示, 与对照组相比, 慢性尿毒症组的血清 DBP 和 SMPD3 mRNA 相对表达量上调 (P 均 < 0.05)。见表 2。

表 1 RT-qPCR 检测各基因引物序列

基 因	正向 (5' → 3')	反向 (5' → 3')	产物长度 / bp
DBP	AAACAGCAAGCCCAAGAACC	GCGTCCAGGTCCACGTATTC	192
RUNX2	CGGACGAGGCAAGAGTTTCA	GGATGAGGAATGCGCCCTAA	192
β -actin	AAGATCAAGATCATTGCTCCTCT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCT	171

表 2 GEO 中慢性尿毒症组与对照组大鼠血清中差异表达基因 mRNA 相对表达量比较

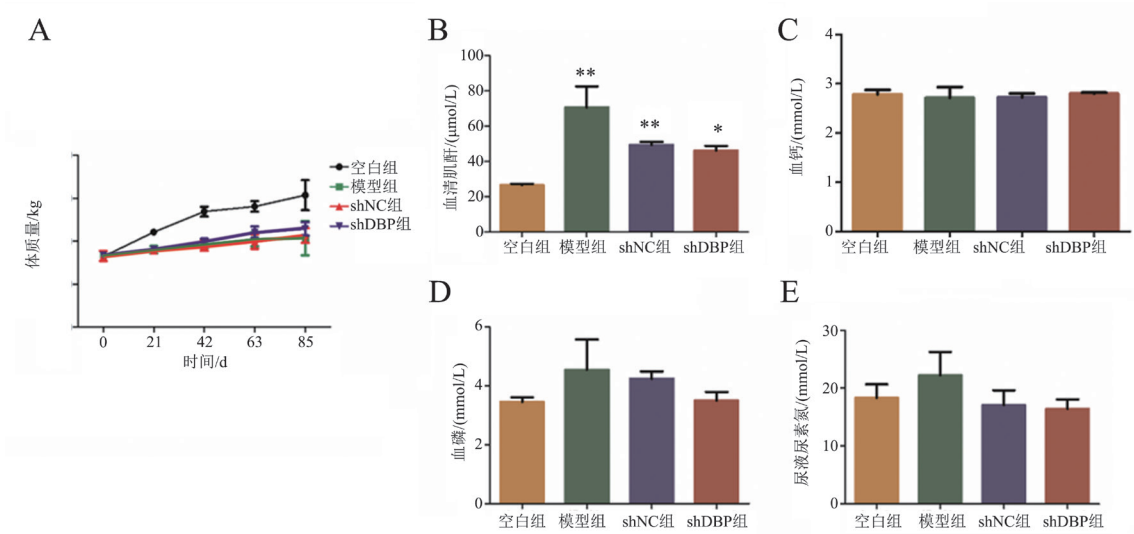
组 别	n	SLC22A2	ATF3	DBP	SMPD3
慢性尿毒症组	5	0.99 \pm 0.45	0.33 (0.17, 1.24)	10.90 (1.56, 20.24)	5.05 (0.80, 9.25)
对照组	5	1.00 \pm 0.42	0.57 (0.41, 1.25)	1.00 (0.19, 1.81)	1.00 (0.07, 1.10)
t/Z 值		0.045	1.663	2.365	2.455
P 值		0.964	0.096	0.018	0.014

二、4组大鼠的一般状态及生化指标比较

喂饲高磷饲料8周并干预治疗4周后，与空白组比较，模型组、shNC组和shDBP组大鼠的体质量较低、血清肌酐水平较高 (P 均 < 0.05)。其中shDBP组大鼠体质量比基线轻微增加，shNC组、shDBP组血清肌酐水平均低于模型组，但比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)；4组的血钙、血磷和尿液尿素氮水平比较差异亦无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见图1。

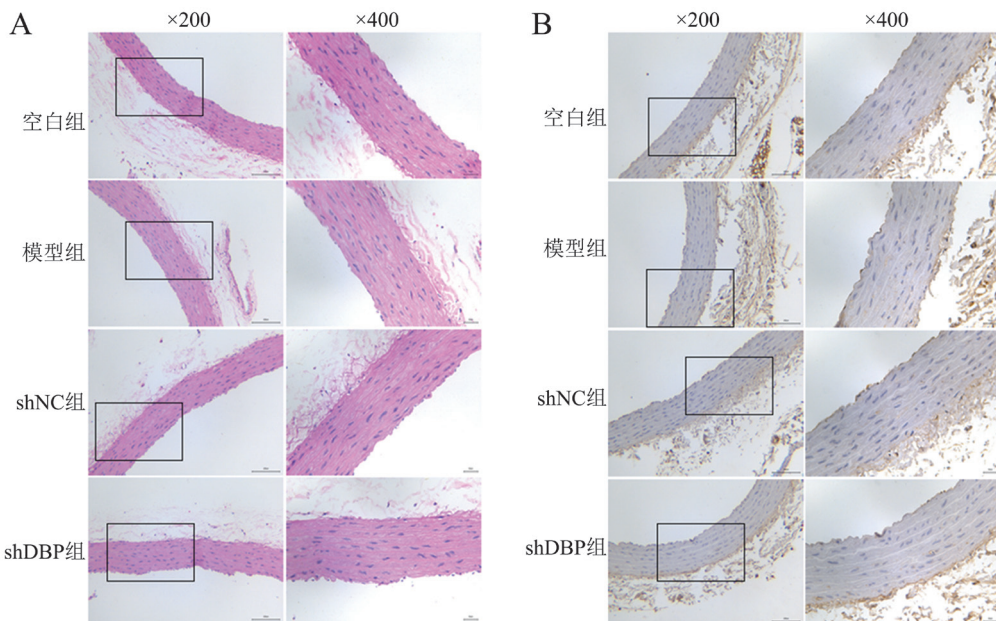
三、4组大鼠的胸主动脉血管病理检查结果比较

喂饲高磷饲料8周并干预治疗4周后，HE染色结果显示，模型组和shNC组胸主动脉壁中膜厚度增厚，shDBP组的增厚程度较模型组减轻；免疫组化检测结果显示模型组和shNC组胸主动脉PCNA表达上调，shDBP组较模型组PCNA表达减弱。见图2。



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图1 4组大鼠的一般状态及生化指标比较



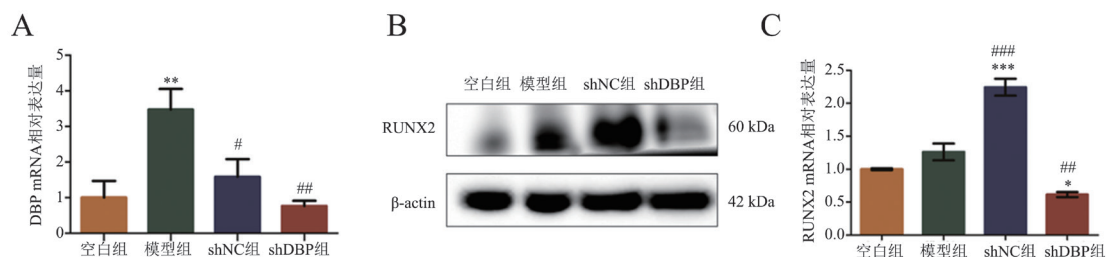
注：A为HE染色结果；B为PCNA蛋白免疫组化检测结果。

图2 4组大鼠胸主动脉HE染色和PCNA蛋白免疫组化结果

四、4组大鼠的胸主动脉血管 DBP 及 RUNX2 表达情况比较

RT-qPCR 结果显示,与空白组相比,模型组 DBP mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$);与模型组相比,shNC 组、shDBP 组胸主动脉血管中 DBP mRNA 表达均下调 (P 均 < 0.05),提示靶向 DBP 的干扰 RNA 能够抑制靶基因表达。RUNX2

mRNA 表达水平显示,与空白组相比,模型组、shNC 组 RUNX2 mRNA 表达上调,其中 shNC 组 RUNX2 表达与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),shDBP 组 RUNX2 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$);RUNX2 蛋白表达丰度也观察到相似的结果。见图 3。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$ 。

图 3 4 组大鼠的胸主动脉血管 DBP 及 RUNX2 表达情况比较

讨 论

DBP 属于 PAR bZIP 家族转录因子,在哺乳动物体内的表达有较大的昼夜节律波动,主要参与细胞生物节律调控。当 DBP 形成二聚体时,它会结合昼夜节律或时钟控制相关基因启动子的 D-box 序列,激活该相关因子的转录调控,从而调节代谢紊乱、氧化应激、激素受体异常或骨稳态等疾病过程^[15-16]。研究表明,骨祖细胞中 DBP 与成骨分化呈正相关^[17]。DBP 过表达通过人亲吻素 1/促性腺激素释放激素/雌二醇(hKiss1/GnRH/E₂)信号通路上调成骨相关标志物,如 RUNX2、骨桥素、Osterix、BMP4、碱性磷酸酶(ALP)活性和钙沉积,而抑制 DBP 表达成骨相关标志物则下调^[18]。

本研究予慢性尿毒症大鼠喂饲特殊配方饲料,以高磷饲料诱导血管钙化模型,经 GEO 数据集分析发现 DBP 在慢性尿毒症组血管组织中上调,构建了 DBP 慢病毒抑制表达载体,通过尾静脉将慢病毒注射到慢性尿毒症大鼠体内,并分析抑制 DBP 表达对慢性尿毒症大鼠血管钙化的影响及其机制。研究结果表明,抑制 DBP 表达可改善尿毒症大鼠血清肌酐水平,同时成骨相关蛋白 RUNX2 的蛋白和 mRNA 表达水平也受到抑制,这可能与 DBP 参与成骨相关蛋白 RUNX2 转录调控有关^[19]。研究表明,血管钙化与软骨和骨形成类似,即通过上调骨形成相关蛋白表达。抑制 DBP 基因能下

调尿毒症大鼠主动脉血管 RUNX2 表达,故能缓解尿毒症大鼠的血管钙化。

综上所述,抑制 DBP 基因可能通过抑制主动脉血管中的 RUNX2 mRNA 和蛋白表达,减轻慢性尿毒症大鼠血管钙化程度和尿毒症相关症状。本研究为利用抑制 DBP 基因修饰减轻慢性尿毒症相关症状和血管钙化提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zununi Vahed S, Mostafavi S, Hosseiniyan Khatibi S M, et al. Vascular calcification: an important understanding in nephrology. *Vasc Health Risk Manag*, 2020, 16 : 167-180.
- [2] Yamada S, Giachelli C M. Vascular calcification in CKD-MBD: roles for phosphate, FGF23, and klotho. *Bone*, 2017, 100 : 87-93.
- [3] Lee S J, Lee I K, Jeon J H. Vascular calcification-new insights into its mechanism. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (8) : 2685.
- [4] Shen J, Zhao M, Zhang C, et al. IL-1 β in atherosclerotic vascular calcification: from bench to bedside. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (15) : 4353-4364.
- [5] Jiang W, Zhang Z, Li Y, et al. The cell origin and role of osteoclastogenesis and osteoblastogenesis in vascular calcification. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8 : 639740.
- [6] Voelkl J, Egli-Spichtig D, Alesutan I, et al. Inflammation: a putative link between phosphate metabolism and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135 (1) : 201-227.
- [7] Liu X, Chen A, Liang Q, et al. Spermidine inhibits vascular calcification in chronic kidney disease through modulation of

- SIRT1 signaling pathway. *Aging Cell*, 2021, 20 (6): e13377.
- [8] Viegas C, Araújo N, Marreiros C, et al. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in chronic kidney disease (CKD): challenging old concepts with new facts. *Aging*, 2019, 11 (12): 4274-4299.
- [9] Byon C H, Chen Y. Molecular mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease: the link between bone and the vasculature. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13 (4): 206-215.
- [10] Zhang J, Zheng B, Zhou P P, et al. Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through Klf5-mediated transactivation of the Runx2 promoter. *Biosci Rep*, 2014, 34 (6): e00148.
- [11] Kwon P K, Lee K H, Kim J H, et al. hnRNP K supports high-amplitude D site-binding protein mRNA (Dbp mRNA) oscillation to sustain circadian rhythms. *Mol Cell Biol*, 2020, 40 (6): e00519-e00537.
- [12] 詹倩倩, 郑敏麟. 益肾降浊冲剂对慢性肾衰竭大鼠肾脏 Fas、FasL 表达的影响. *福建中医药*, 2021, 52 (5): 48-49, 52.
- [13] 陈琪琪, 谭茹瑜, 朱婷婷, 等. 慢性肾脏病血管钙化大鼠模型血清中 HIF-1 α 、 β -catenin 的表达及意义. *海南医学院学报*, 2021, 27 (9): 656-660.
- [14] Rukov J L, Gravesen E, Mace M L, et al. Effect of chronic uremia on the transcriptional profile of the calcified aorta analyzed by RNA sequencing. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310 (6): F477-F491.
- [15] Lu Y, Mei Y, Chen L, et al. The role of transcriptional factor D-site-binding protein in circadian CCL2 gene expression in anti-Thy1 nephritis. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16 (9): 735-745.
- [16] Suzuki C, Ushijima K, Ando H, et al. Induction of Dbp by a histone deacetylase inhibitor is involved in amelioration of insulin sensitivity *via* adipocyte differentiation in ob/ob mice. *Chronobiol Int*, 2019, 36 (7): 955-968.
- [17] Li S, Hunger S P. The DBP transcriptional activation domain is highly homologous to that of HLF and TEF and is not responsible for the tissue type-specific transcriptional activity of DBP. *Gene*, 2001, 263 (1/2): 239-245.
- [18] Zhao Y, Wu Y, Wang J, et al. Circadian transcription factor Dbp promotes rat calvarial osteoprogenitors osteogenic differentiation through Kiss1/GnRH/E₂ signaling pathway loop. *J Cell Biochem*, 2021, 122 (2): 166-179.
- [19] Kwon P K, Kim H M, Kim S W, et al. The poly (C) motif in the proximal promoter region of the D site-binding protein gene (Dbp) drives its high-amplitude oscillation. *Mol Cell Biol*, 2019, 39 (16): e00101-e00119.

(收稿日期: 2022-03-30)

(本文编辑: 林燕薇)