

# 血管钙化大鼠肾动脉 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路的表达\*

覃春美, 魏 晓, 龚财判, 吴蔚桦, 刘 建, 樊均明, 欧三桃<sup>△</sup>

泸州医学院附属医院 肾病内科 (泸州 646000)

**【摘要】** 目的 观察血管钙化大鼠模型肾动脉上骨形态蛋白 2(BMP2)/Smad1/Runt 相关转录因子 2(Runx2) 信号通路的表达及其变化规律,探讨 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路激活在肾动脉钙化中的作用。方法 将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和钙化组,钙化组建立维生素 D3 和尼古丁诱导的大鼠血管钙化模型,对照组给予生理盐水和花生油。6 周后采用 Von Kossa 染色检测肾动脉钙化程度,钙离子试剂盒测定大鼠肾动脉钙含量,实时荧光定量 PCR 检测肾动脉组织中 BMP2、Smad1、Runx2 mRNA 水平,免疫组化法观察 BMP2、Smad1、Runx2 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达。结果 Von Kossa 染色见钙化组大鼠肾动脉有大量黑色颗粒沉淀。钙化组血管钙含量高于对照组( $P < 0.05$ )。与对照组相比,钙化组大鼠肾动脉组织 BMP2、Smad1、Runx2 mRNA 的水平升高( $P < 0.05$ ),BMP2/Smad1/Runx2 信号通路蛋白在肾动脉的表达亦同步上调,而  $\alpha$ -SMA 的表达较对照组下降( $P < 0.05$ )。相关分析表明,大鼠肾血管钙含量与肾动脉组织 BMP2 mRNA( $r = 0.655, P < 0.05$ )、Smad1 mRNA ( $r = 0.735, P < 0.05$ )、Runx2 mRNA ( $r = 0.734, P < 0.05$ )均呈正相关。结论 BMP2/Smad1/Runx2 通路的表达变化与肾动脉钙化的严重程度相关,提示 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路参与了肾动脉钙化的发生发展。

**【关键词】** 血管钙化 骨形态蛋白 2 信号通路 大鼠

**Expression of BMP2/Smad1/Runx2 Signal Pathway in Renal Artery of Rat with Vascular Calcification** QIN Chun-mei, WEI Xiao, GONG Cai-pan, WU Wei-hua, LIU Jian, FAN Jun-ming, OU San-tao<sup>△</sup>. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: ousantao@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the activation and its role of bone morphogenetic protein 2 (BMP2)/Smad1/Runt-related transcription factor 2 (Runx2) signal pathway in renal artery of rat models with vascular calcification. **Methods** Twenty four male SD rats were randomly divided into control group and calcification group. Rat vascular calcification model was constructed by administration of vitamin D3 plus nicotine. Vascular calcification was confirmed by Von Kossa staining and calcium content was detected by calcium assay. Real time-PCR was applied to detect the expression of BMP2, Smad1, Runx2 mRNA, and immunohistochemistry was used to measure the protein levels of BMP2, Smad1, Runx2,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). **Results** Von Kossa staining showed a large number of black granules deposited in renal artery. Calcium content in calcification group was significantly higher than that in normal group. Compared with the control group, the expressions of BMP2, Smad1 and Runx2 mRNA in renal artery were increased in calcification group. The protein levels of BMP2, Smad1 and Runx2 were higher while the expression of  $\alpha$ -SMA was lower in calcification group than those in control group. The correlation analysis was found a positive correlation between the calcium content and BMP2 mRNA ( $r = 0.655, P < 0.05$ ), Smad1 mRNA ( $r = 0.735, P < 0.05$ ), Runx2 mRNA ( $r = 0.734, P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of BMP2/Smad1/Runx2 signal pathway was strongly correlated with the severity of vascular calcification, which may be involved in the occurrence and development of vascular calcification.

**【Key words】** Vascular calcification Bone morphogenetic protein 2 Signal pathway Rat

血管钙化是动脉粥样硬化、糖尿病、慢性肾脏病、衰老、高血压等多种疾病的病理生理基础,是导致心血管疾病发生发展和致死的重要原因。最近研究表明,血管钙化是一个与骨发生类似的积极主动

调节过程,且涉及一些不同的骨相关蛋白的表达<sup>[1]</sup>。骨形态蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)/Smads/Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 信号通路的激活是骨组织形成过程所必需的,BMP2、Smad1 和 Runx2 作为高效的骨诱导因子,可能与血管钙化的形成有非常密切的关系<sup>[2-5]</sup>。然而,目前对血管钙

\* 四川省医学会(川学会医字[2013]63号)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: ousantao@163.com

化时 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路激活情况的研究较少。为此,本研究在维生素 D3 及尼古丁诱导的大鼠血管钙化模型上,观察了肾动脉钙化时 BMP2 及其下游因子的激活及表达变化,以探讨该信号通路激活在血管钙化发生发展中的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 170 ~ 220 g〔泸州医学院实验动物中心,许可证号:SYXK(川 2013-065)〕。

**1.1.2 主要试剂** 维生素 D3(Sigma 公司),尼古丁(Merck 公司),钙离子检测试剂盒(南京建成生物有限公司),生物素化羊抗兔 IgG(美国 Carlsbad 公司),BMP2 多克隆抗体(1:100)、Smad1 抗体(1:150 Bioworld 公司),Runx2 抗体(1:100 北京博奥森), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(1:100)、即用型 ABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司),PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(大连宝生物公司)。

**1.1.3 引物合成** 由上海生物工程有限公司合成,BMP-2、Smad1 和 Runx2 引物序列如下。BMP2 引物,F:5'-CAGCGAGTTTGAGTTGAGG-3',R:5'-CGGTACAGGTCGAGCATAT-3',扩增产物长度 104 bp;Smad1 引物,F:5'-ATACCACCGCCAG GATGTTAC-3',R:5'-CCAACAGTTGGTCACA GAGGTC-3',扩增产物长度 256 bp;Runx2 引物,F:5'-CCCAACTTCTGTGCTCC-3',R:5'-AGT GAAACTCTTGCCCTCGTC-3',扩增产物长度 240 bp;GAPDH 引物,F:5'- CCTCAAGATTGTC AGCAAT-3',R:5'- CCATCCACAGTCTTCTGA GT-3',扩增产物长度 140 bp。

### 1.2 方法

**1.2.1 制备钙化动物模型** 大鼠随机分两组,每组 12 只;钙化组予以维生素 D3(300 000 U/kg)肌肉注射 1 次,尼古丁(25 mg/kg)溶于花生油中灌胃,9 h 后再重复灌胃 1 次;对照组给予等量 0.9%氯化钠液肌肉注射及单纯花生油灌胃。两组大鼠常规饲养 6 周称重后,用戊巴比妥钠麻醉,然后摘取肾动脉,用冰 0.9%氯化钠液冲洗后,部分固定于中性多聚甲醛液,经脱水、透明、包埋,制成肾动脉组织石蜡块,其余组织冻存于 -80 °C 冰箱中待测。

**1.2.2 肾动脉 Von Kossa 染色** 取大鼠肾动脉,

包埋后制作石蜡切片,常规脱蜡、脱水。浸入 2%硝酸银液,在紫外线下照射约 30 min 后,将切片置于 5%硫代硫酸钠液中 1 min,伊红溶液复染。经脱水、透明、封片,行光镜观察。

**1.2.3 肾动脉钙含量测定** 取肾动脉组织,用滤纸吸干后加入 2 mol/L 硝酸 0.5 mL,180 °C 消化并烘干,冷却后加入含氯化钾和氯化镧的去离子水复溶,取样品约 1.5 mL,加入 1%氯化锶溶液 150  $\mu$ L,用原子吸收分光光度计测各管的光密度值,并换算成  $\mu$ mol/(g·wt)。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 测定肾动脉 BMP2、Smad1、Runx2 mRNA 水平** 按照产品说明书用总 RNA 提取试剂盒 RNA simple Total RNA Kit(北京天根生化科技有限公司)提取总 RNA,用逆转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 将 mRNA 反转录为 cDNA,荧光定量 PCR 扩增条件为:95 °C 预变性 30 s,40 个循环内 95 °C 变性 5 s,58 °C 退火 34 s。实时记录 cDNA 的扩增:包括有扩增曲线和熔解曲线,并在仪器默认条件下进行分析。目的基因与内参 GAPDH 在同一条件下进行反应。通过 StepOne 软件分析,按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算目的基因相对表达量。

**1.2.5 免疫组化** 按照免疫组化试剂盒说明,采用 ABC 法,肾动脉组织石蜡切片脱蜡至水后,热修复抗原,山羊血清封闭非特异抗原,依次滴加一抗、二抗、ABC 复合物、DAB 显色液,苏木素复染后脱水、透明、中性树胶封片。以出现棕黄色颗粒为阳性信号。用 Image-Pro Plus 图像分析软件,分别统计 BMP2、Smad1、Runx2 及  $\alpha$ -SMA 免疫组化阳性细胞占全体细胞百分比。

**1.2.6 统计学方法** 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用  $t$  检验,相关性分析用 Pearson 相关。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肾动脉钙化的特征

Von Kossa 染色见钙化组肾动脉中膜弹性纤维间大量的黑色颗粒,沉积于细胞外基质及平滑肌细胞内,表明存在钙盐沉积(图 1)。钙化组肾动脉钙含量[(29.788  $\pm$  7.409)  $\mu$ mol/(g·wt)]高于对照组[(6.240  $\pm$  1.774)  $\mu$ mol/(g·wt)]( $P < 0.01$ )。

**2.2 大鼠肾动脉 BMP2、Smad1、Runx2 mRNA 水平**

与对照组大鼠相比,钙化组肾动脉组织 *BMP2*、*Smad1*、*Runx2* mRNA 水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 1)。

### 2.3 大鼠肾动脉组织 *BMP2*、*Smad1*、*Runx2* 及 $\alpha$ -SMA 蛋白的表达

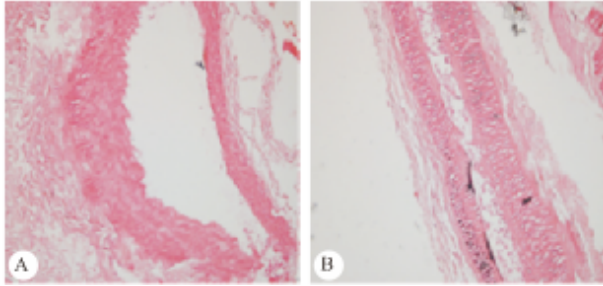


图 1 大鼠肾动脉 Von Kossa 染色情况。×200

Fig 1 Von Kossa staining of the renal artery in rats. ×200

A: Control group; B: Calcification group

免疫组化结果显示,在钙化组肾动脉血管中膜平滑肌细胞中,*BMP2*、*Smad1*、*Runx2* 蛋白表达较正常组明显增多,阳性着色较深,胞浆呈大量棕黄色,而平滑肌细胞特异标记  $\alpha$ -SMA 的表达较正常组显著减少(图 2,表 2)。

### 2.4 大鼠肾动脉 *BMP2*、*Smad1*、*Runx2* 表达与肾动脉钙化程度相关性分析

相关分析表明,大鼠肾血管钙含量与肾动脉组织 *BMP2* mRNA ( $r=0.655$ ,  $P<0.05$ )、*Smad1* mRNA ( $r=0.735$ ,  $P<0.01$ )、*Runx2* mRNA ( $r=$

表 1 大鼠 *BMP2*、*Smad1* 和 *Runx2* mRNA 的表达( $n=12, \bar{x} \pm s$ )  
Table 1 The expression of *BMP2*, *Smad1* and *Runx2* mRNA in rats ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Group	<i>BMP2</i>	<i>Smad1</i>	<i>Runx2</i>
Control	0.841±0.190	0.929±0.156	1.564±0.350
Calcification	1.192±0.202 <sup>#</sup>	1.272±0.187 <sup>*</sup>	1.805±0.165 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>  $P<0.05$ , <sup>\*</sup>  $P<0.01$ , vs. control group

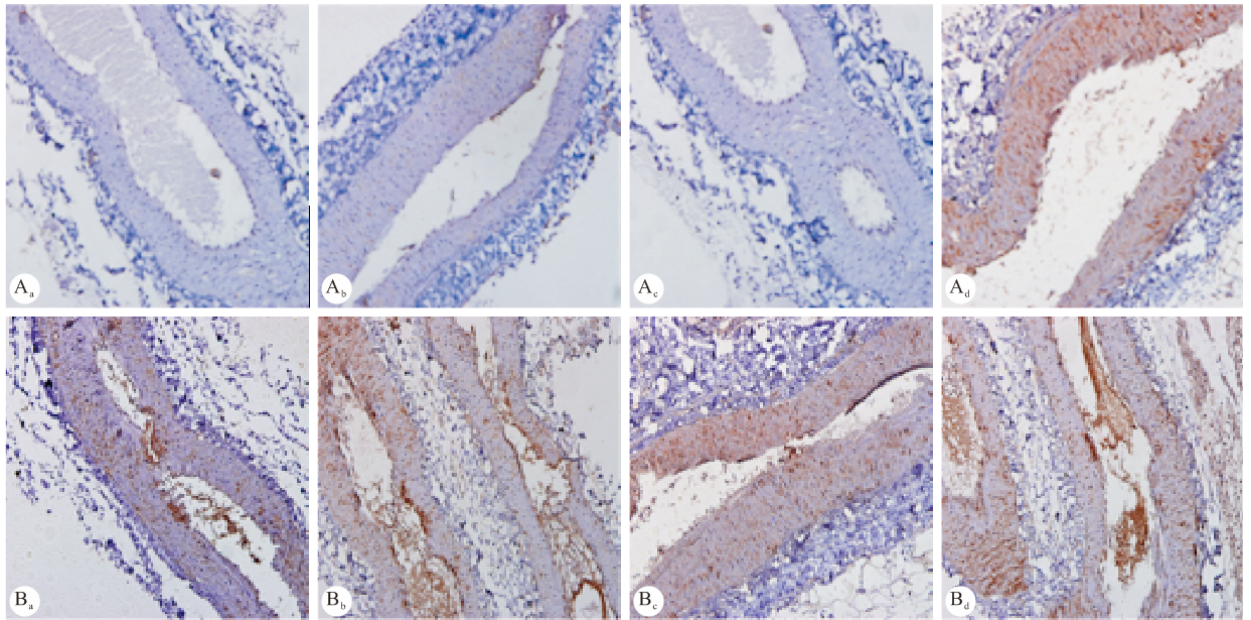


图 2 免疫组化检测 *BMP2*(a)、*Smad1*(b)、*Runx2*(c)及  $\alpha$ -SMA(d)的表达。ABC ×200

Fig 2 Expression of *BMP2* (a), *Smad1* (b), *Runx2* (c) and  $\alpha$ -SMA (d) detected by IHC. ABC ×200

A: Control group; B: Calcification group

表 2 大鼠 *BMP2*、*Smad1*、*Runx2* 和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The protein expressions of *BMP2*, *Smad1*, *Runx2* and  $\alpha$ -SMA in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

	<i>n</i>	<i>BMP2</i> (%)	<i>Smad1</i> (%)	<i>Runx2</i> (%)	$\alpha$ -SMA (%)
Control group	12	12.59±8.19	16.68±10.56	20.64±16.35	81.36±4.75
Calcification group	12	37.69±13.20 <sup>*</sup>	50.27±17.87 <sup>*</sup>	65.85±21.16 <sup>*</sup>	58.62±11.54 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>  $P<0.01$ , vs. control group

0.774,  $P<0.01$ )均呈正相关。

## 3 讨论

目前常用诱导在体血管钙化模型的方法主要有

药物诱导、基因敲除、慢性肾功能衰竭及高脂饮食近交培育等。其中,维生素 D3 和尼古丁联用制备大鼠血管钙化模型,具有操作简便、诱导时间短、动物存活率高、成本较低等优点,是目前基础研究中最常

用的血管钙化模型。既往对血管钙化的研究主要集中在心脑血管病变,对肾动脉钙化的作用研究不是很充分,近期一项研究表明,肾动脉钙化可能是唯一与慢性肾脏病和微量蛋白尿有关的危险因素<sup>[6]</sup>。Tolkin 等<sup>[7]</sup>发现,肾动脉钙化程度与肾动脉粥样硬化和狭窄的程度有较强的相关性。此外,相关研究显示,糖尿病肾病患者早期无明显临床症状时即可发现较明显的肾动脉钙化,肾动脉钙化是糖尿病肾病患者进展至终末期肾病的独立预测因子<sup>[8]</sup>。以上资料充分表明:对肾动脉钙化的研究有着十分重要的意义。本实验采用大剂量维生素 D3 联合尼古丁制备大鼠肾动脉血管钙化模型,发现钙化组大鼠肾动脉组织钙含量增加,肾动脉中膜、弹力膜大量钙沉积,钙化组大鼠成骨样细胞标志物 BMP2 含量明显增加,而平滑肌细胞标志物  $\alpha$ -SMA 表达明显减少,提示成功诱导大鼠肾动脉钙化模型。

血管钙化既往被认为是一个与衰老、动脉粥样硬化和一些代谢相关疾病有关的钙盐被动沉积过程。然而,最近研究表明血管钙化形成过程同骨和软骨的发育相似,是主动的、可预防、可逆转的生物学过程,其中心环节是血管平滑肌细胞向成骨样细胞的转分化<sup>[9]</sup>。BMP2 作为一种骨相关蛋白,是目前研究最多、促进骨形成和诱导成骨细胞分化作用最强的细胞外信号分子。BMP2 参与成骨分化的主要信号通路是 BMP2/Smad1/Runx2 轴,BMP2 与受体结合后激活 Smads 复合物,正向调节成骨细胞和软骨细胞分化的核心转录因子 Runx2,从而促进骨形成或成骨分化。近年研究显示 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路与血管钙化的发生发展有密切联系,Balderman 等<sup>[10]</sup>发现,用 BMP2 刺激冠脉平滑肌细胞时,24 h 内即可见 Runx2 蛋白表达增加,同时细胞内钙沉积量显著增加。Liberman 等<sup>[11]</sup>也发现 BMP2 通过增强氧化应激和内质网压力来增加 Runx2 的表达,从而促进血管钙化的发生。Miller 等<sup>[12]</sup>用高脂喂养小鼠,发现小鼠主动脉瓣膜发生钙化的数量速度及 BMP2、Smad1、Runx2 的表达明显较对照组增加。本研究用维生素 D3 和尼古丁诱导肾动脉钙化,研究结果显示 BMP2、Smad1、Runx2 在正常小鼠肾动脉组织中仅有极少量表达,而在肾动脉钙化模型中表达升高,并与肾动脉钙化的严重程度呈正相关,提示 BMP2/Smad1/Runx2 信号通路参与了肾动脉钙化的发生、发展,BMP2 参与血管钙化是通过影响其信号通路的级联反应,增强其下游信号分子 Smad1 的表达,增加

Runx2 分泌,从而加速了血管平滑肌细胞向成骨细胞转分化的进程。

综上所述,维生素 D3 和尼古丁诱导的大鼠肾动脉钙化模型中,存在 BMP2/Smad1/Runx2 通路的激活,且参与了肾动脉钙化的发生发展。BMP2/Smad1/Runx2 信号通路不仅在骨代谢中起重要作用,其在血管钙化中扮演的角色也越来越受到重视,BMP2/Smad1/Runx2 信号通路有望成为血管钙化的治疗靶点。

## 参 考 文 献

- 1 Valdivielso JM. Vascular calcification: types and mechanisms. *Nefrologia*, 2011; 31(2): 142-147.
- 2 Nakagawa Y, Ikeda K, Akakabe Y, *et al.* Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; 30(10): 1908-1915.
- 3 Yao Y, Bennett BJ, Wang X, *et al.* Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res*, 2010; 107(4): 485-494.
- 4 Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, *et al.* Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves—association with low BMP antagonists and SMAD6. *PLoS One*, 2011; 6(6): e20969. doi: 10.1371/journal.pone.0020969.
- 5 Sun Y, Byon CH, Yuan K, *et al.* Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res*, 2012; 111(5): 543-552.
- 6 Roseman DA, Hwang SJ, Manders ES, *et al.* Renal artery calcium, cardiovascular risk factors and indices of renal function. *Am J Cardiol*, 2014; 113(1): 156-161.
- 7 Tolkin L, Bursztyn M, Ben-Dov IZ, *et al.* Incidental renal artery calcifications: a study of 350 consecutive abdominal computed tomography scans. *Nephrol Dial Transplant*, 2009; 24(7): 2170-2175.
- 8 Chiu YW, Adler S, Budoff M, *et al.* Prevalence and prognostic significance of renal artery calcification in patients with diabetes and proteinuria. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010; 5(11): 2093-2100.
- 9 Speer MY, Li X, Hiremath PG, *et al.* Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2010; 110(4): 935-947.
- 10 Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc*, 2012; 1(6): e003905. doi: 10.1161/JAHA.112.003905.
- 11 Liberian M, Johnson RC, Handy DE, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011; 413(3): 436-441.
- 12 Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, *et al.* Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; 30(12): 2482-2486.