

· 论 著 ·

BMP-2 在糖尿病肾病大鼠肾内小动脉中表达的意义*

赵安菊¹, 黄颂敏^{2△}, 欧三桃², 焦桂萍¹, 王 里¹, 陈 超¹

(1. 四川大学华西医院肾内科, 成都 640000; 2. 贵州省人民医院干医科, 贵阳 550001)

摘要:目的 观察骨形态蛋白 2(BMP-2)在糖尿病肾病(DN)大鼠肾实质内小动脉上的表达及其变化规律,探讨其对糖尿病肾病血管病变的影响。**方法** 设对照组(N组)和糖尿病肾病组(DN组),建立链脲佐菌素(STZ)诱导的 DN 大鼠模型。茜素红染色观察肾实质内小动脉周围钙盐沉积,并分别采用免疫组化及 mRNA 原位杂交法检测 BMP-2 在肾实质内小动脉上的蛋白表达及基因定位。**结果** (1)茜素红染色 DN 组第 4~12 周时偶见肾内小动脉少许点状红色钙盐沉积,第 24 周时可见肾实质内小动脉及周围组织有较多红色点片状沉积,N 组茜素红染色为阴性。(2)DN 组肾实质内小动脉 BMP-2 蛋白及 mRNA 在 4 周时已有表达,随时间延长表达逐渐增强,各时间点均明显高于 N 组,N 组各时间点表达差异无统计学意义。**结论** (1)DN 大鼠肾内小动脉钙化前即已有 BMP-2 的表达;(2)BMP-2 可能是糖尿病血管钙化的重要转录因子及早期生物学标志之一;(3)肾内小动脉上 BMP-2 的表达变化可能参与 DN 进展。

关键词:糖尿病肾病;血管钙化;骨形态蛋白 2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.002

中图分类号:R587.2;R543

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3004-03

Significance of BMP-2 expression at renal arteriole in diabetic nephropathy rats*

ZHAO An-ju¹, HUANG Song-min^{2△}, OU San-tao², et al.

(1. Department of Nephrology, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 640000, China;

2. Department of Cardres, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550001, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) in renal arteriole, and to explore its effect to vascular lesion of diabetic nephropathy. **Methods** Adult Sprague - Dawley male rats were divided into diabetic group and control group. Paraffin sections of renal tissue of rats at the same time points were stained by routine methods and alizarin red, immunohistochemistry, hybridization in situ. **Results** (1) A bit of calcium salt deposited in renal arteriole at 4 week and a lot calcium salt at 24 weeks. (2) From 4 week, the number of BMP-2 staining and mRNA in diabetic renal arteriole was significantly increased as compared with control group. **Conclusion** (1) BMP-2 has already expressed in renal arteriole before the formation of vascular calcification. (2) Before vascular calcification, BMP-2 in diabetic renal arteriole is significantly upregulated, which indicates that BMP-2 is one of key regulating factors of diabetic vascular calcification. (3) Alteration of the expression of BMP-2 in renal arteriole may indicate that it participates in the development of DN.

Key words: diabetic nephropathy; vascular calcification; bone morphogenetic protein-2

骨形态蛋白 2(BMP-2)是诱导骨和软骨生成的有效的生长因子,在骨形成中具有重要作用,BMP-2 自身具有巨大的启动骨形成的能力^[1]。骨形成蛋白调节学说认为,损伤的血管、粥样硬化的动脉以及钙化的心脏瓣膜均含有基质囊泡和骨的所有关键成分,钙化及动脉粥样硬化损伤的内皮细胞中均有 BMP-2 的表达^[2]。

大血管钙化是糖尿病糖尿病(diabetes mellitus, DM)的严重并发症,既往对 DM 血管钙化的实验研究多集中于冠状动脉、肾动脉等大动脉,而 DM 的血管病变还包括小血管和微血管的病变,它们是导致多种器官损害的病理生理基础,可致血流动力学异常、组织缺氧等,因此研究 DM 的小血管病变具有重要意义。BMP-2 在 DM 的微血管病变——糖尿病肾病(DN)的发病机制中是否起着关键作用值得探讨,目前对肾脏实质内小血管改变知之甚少,因此作者拟通过建立链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的 DN 大鼠模型,动态观察骨基质蛋白 BMP-2 在肾实质内小动脉上有无表达及其表达变化规律,进一步明确 DN 时肾实质内的小动脉是否有血管钙化的发生并探讨其在 DN 病程进展中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 8 周龄雄性 SD 大鼠 70 只,体质量 150~200 g,购自四川大学华西医学动物中心。

1.1.2 主要试剂 STZ(美国 Sigma 公司),MAXVISION 试剂盒(福建迈新公司),BMP-2 多克隆抗体、地高辛标记原位杂交试剂盒(武汉博士德公司)等。

1.1.3 探针合成 由大连宝生物公司设计合成 BMP-2 原位杂交探针,5'-GCCTGAAGCAGAGACCCACCCCA-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模及分组 将 70 只雄性 SD 大鼠随机分为糖尿病肾病组(DN 组)及对照组(N 组),DN 组采用 STZ 55 mg/kg 一次性腹腔注射,N 组予等量柠檬酸缓冲液。以连续 3 次血糖大于 16.6 mmol/L、尿量大于原尿量 150%、尿蛋白排泄大于 30 mg/24 h 者为成模标准。第 4、12、24 周时处死大鼠。留取 24 h 尿液并经股静脉取血,检测血糖、24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐、血钙、血磷等。血糖检测采用酶电解层析法,尿蛋白定量检测使用双缩脲比色法,血尿素氮测定用 GLDH 动

* 基金项目:贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 J 字[2008]2299 号)。△ 通讯作者。

表 1 两组不同时间点血糖、肾功能、血钙、血磷及尿蛋白量(24 h)的变化($\bar{x} \pm s$)

项目	N 组			DN 组		
	4 周	12 周	24 周	4 周	12 周	24 周
血糖(mmol/L)	5.47±0.17	5.44±0.29	5.51±0.23	22.63±7.10 ^e	25.83±3.72 ^c	26.24±3.28 ^c
BUN(mmol/L)	6.83±0.13	7.10±0.32	6.95±0.27	11.35±3.14 ^e	14.17±3.24 ^c	14.25±4.28 ^c
Scr(μ mol/L)	53.75±8.78	60.76±12.23	58.97±9.79	63.25±12.76	89.68±8.93 ^{ac}	125.76±18.58 ^{abc}
Ca(mmol/L)	2.3±0.32	2.26±0.33	2.62±0.4	2.53±0.24	2.51±0.39	2.91±0.33
P(mmol/L)	1.66±0.29	1.72±0.32	1.78±0.29	1.91±0.54	3.18±0.74 ^a	3.81±0.29 ^a
尿蛋白量(mg/24 h)	15.52±3.20	17.73±2.36	16.86±2.83	80.56±7.07 ^c	103.37±12.89 ^{ac}	91.62±10.52 ^{abc}

与 DN 组 4 周比较, ^a: $P < 0.05$; 与 DN 组 12 周比较, ^b: $P < 0.05$; 与 N 组同时时间点比较, ^c: $P < 0.05$ 。

力学法, 血肌酐浓度测定用酶法。经腹主动脉灌注生理盐水后摘取右肾。一半肾组织用含 0.1% DEPC 的 4% 多聚甲醛固定, 经脱水、透明、包埋, 制成肾组织石蜡块。

1.2.2 肾组织病理检查及茜素红染色 肾组织经常规脱水、包埋, 行 HE 染色镜下观察肾组织病理改变。行茜素红染色, 观察肾实质内小动脉及周围组织钙盐沉积情况。茜素红染色步骤为切片脱蜡至水后用自来水洗 2 min, 0.1% 茜素红 S 染色 30 min, 甘油明胶封片。钙盐沉积处即阳性区域染为红色, 阴性区域为浅红色。根据钙盐沉积分为 0~4 级^[3]。0 级: 无钙盐沉积; 1 级: 点状沉积; 2 级: 单个片状沉积; 3 级: 多个片状沉积; 4 级: 弥漫性围绕管腔沉积。每个标本染 2 张片, 取其平均值。积分小于 1 级定义为无钙化; 1~2.5 级为轻中度钙化, >2.5~4 级为重度钙化。病理染色结果由 2 个病理医师判断并报告。

1.2.3 免疫组化 切片脱蜡至水后, 用 3% H₂O₂ 溶液灭活内源性过氧化物酶, 高压或酶消化修复抗原, 加入 BMP-2 多克隆抗体(1:40) 4℃ 过夜, PBS 代替一抗作阴性对照。滴加 50 μ L 即用型 MaxVision™ 试剂, 室温下孵育 10 min, 滴加 DAB 显色液, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片。以出现棕黄色颗粒为阳性信号。采用全自动图像分析系统(美国 Image-proplus4.5) 分别计算其吸光度, 取其均值进行分析。

1.2.4 原位杂交 切片脱蜡至水后, 用 0.1% 胃蛋白酶(200 μ g/mL) 37℃ 消化 15 min, 预杂交缓冲液孵育 30 min。滴加 20 μ L 杂交液, 加入 BMP-2 探针(40 ng/ μ L), 42℃ 杂交过夜。滴加封闭液, 37℃ 孵育 30 min。滴加兔抗地高辛-BSA, 37℃ 孵育 1 h。滴加生物素化地高辛标记兔抗体, 37℃ 孵育 1 h。滴加 AP-羊抗兔 IgG(1:100), 37℃ 孵育 30 min。AP-Red 显色液。采用全自动图像分析系统(美国 Image-proplus4.5) 分别计算其吸光度, 取其均值进行分析。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.5 统计软件处理。采用单因素方差分析, 多个样本均数两两比较采用 q 检验, 组间同时时间点比较采用独立样本均数 t 检验, 用 Person 方法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生化指标 DN 组各时间点血糖及尿蛋白量(24 h) 均较 N 组显著增高($P < 0.05$)。自第 12 周开始, DN 组血肌酐、血磷较 N 组明显增高($P < 0.05$), 两组血钙各时间点无明显变化。见表 1。

2.2 HE 染色及茜素红染色 DN 组 4 周时出现系膜区增宽, 肾小球、肾小管纤维结缔组织明显增生, 在 24 周时出现肾小球萎缩。N 组肾小球、小管间质、肾血管未见明显异常。茜素红染色 DN 组第 4~12 周时偶见肾内小动脉少许点状红色钙盐

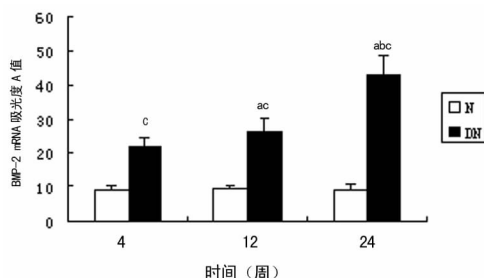
沉积, 第 24 周时可见肾内小动脉及周围组织有较多红色点片状沉积, N 组茜素红染色为阴性。根据钙化程度分级分析, DN 组第 24 周肾内小动脉存在轻至中度钙化, N 组各时间点肾组织及肾内小动脉无钙化。见彩插 I 图 1。

2.3 两组肾组织 BMP-2 蛋白表达及 mRNA 原位杂交 DN 组 BMP-2 蛋白突出表达于肾实质内小动脉上, 肾小球及肾小管上也有阳性表达。自第 4 周起, BMP-2 在血管上表达逐渐增多, 第 24 周时表达最明显。N 组肾小球及肾实质内小动脉上均无 BMP-2 表达。DN 组 BMP-2 mRNA 只表达于肾实质内小动脉上, 小管和小球上无表达, 自第 4 周起 BMP-2 mRNA 表达量开始升高, 以后随病程进展表达逐渐上调, 在 24 周时表达达峰值。N 组 BMP-2 肾内小动脉上表达较弱, 随病程进展, 表达量差异无统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、彩插 I 图 2 及图 3。

表 2 两组不同时间点肾小动脉 BMP-2 阳性着染 (A 值, $n=6, \bar{x} \pm s$)

时间	BMP-2		
	4 周	12 周	24 周
N 组	0	0	0
DN 组	0.84±0.20	0.90±0.27	1.18±0.47 ^d

^d: 与 DN 组 4 周比较, $P < 0.05$ 。



^a: 与 DN 组 4 周比较, $P < 0.01$; ^b: 与 DN 组 12 周比较, $P < 0.01$; ^c: 与 N 组同时时间点比较, $P < 0.01$ 。

图 3 两组不同时间点肾脏 BMP-2 mRNA 表达情况($n=6$)

2.4 DN 组各指标相关性分析 DN 组 BMP-2 表达与尿蛋白、血肌酐、血磷($r=0.422, P < 0.01; r=0.743, P < 0.01; r=0.671, P < 0.01$)呈正相关。

3 讨 论

血管钙化可使血管的硬度增加, 顺应性降低, 易导致心肌缺血、心力衰竭、心肌梗死和卒中等心脑血管事件的发生, 是心、脑血管病及外周血管病等的主要危险因素之一^[4-5]。DM 患者较非 DM 患者更易发生血管钙化, 而 DN 者冠脉钙化较单纯的 DM 患者更为普遍和严重^[6]。DN 是糖尿病微血管病变

中最常见、最严重的并发症之一,当肾组织已具有明显的病理变化,而患者往往还未出现明显临床或实验室检查方面的异常时^[3],其病理改变主要表现为肾内微血管和中等大小动脉的硬化及钙化。传统观点认为血管钙化是不可调控的、不可逆的,是矿物质在血液中过度饱和造成的被动沉淀,是动脉粥样硬化自然形成部分。近年在动脉硬化研究中发现血管钙化发生在动脉粥样硬化形成早期阶段,是类似骨发育的、主动的、可调控的生物学过程。许多骨相关蛋白和血管活性物质可能参与了钙化的调控,这些蛋白在血管局部的表达以及表达变化的失调,对血管钙化的发生、发展起着非常重要的调节作用^[7]。BMP-2 是与血管钙化关系密切的骨基质蛋白,BMP-2 可诱导非骨组织来源的细胞分化为成骨细胞,导致异位成骨^[8],是一种致血管钙化最强有力的蛋白,因此研究 DN 时肾实质内小动脉有无 BMP-2 表达,如有表达其变化规律如何对于探讨 DN 的发病机制以及寻求 DN 治疗的有效措施具有重要意义。

本实验生化检测结果显示, DN 组各时间点血糖及尿蛋白量(24 h)明显高于 N 组,说明造模成功,肌酐及血磷 12 周以后明显升高,提示肾脏损害进行性加重。两组 HE 染色也提示 DN 组 4 周时已出现系膜区增宽,肾小球增大,肾小管扩张。在 24 周时出现肾小球硬化征象,小管萎缩,间质大量炎症细胞浸润。茜素红染色 DN 组第 4~12 周时偶见肾内小动脉少许点状红色钙盐沉积,第 24 周时可见肾内小动脉及周围组织有较多红色点片状沉积, N 组茜素红染色为阴性。根据钙化程度分级分析, DN 组第 24 周肾内小动脉存在轻至中度钙化, N 组各时间点肾组织及肾内小动脉无钙化。免疫组化、原位杂交结果证实 DN 肾实质小动脉存在骨基质蛋白 BMP-2 表达,并随病程进展存在异常改变,早期即有 BMP-2 基因和蛋白表达,随病程进展表达逐渐增加。 N 组肾小球、肾小管间质、肾血管未见 BMP-2 表达。

由上可知,肾内小动脉在 DN 早期即在发生血管钙化前就已有骨基质蛋白 BMP-2 的表达,提示 BMP-2 可能参与了早期 DN 的发生、发展, BMP-2 的表达还与肌酐及尿蛋白增高呈正

相关,说明 BMP-2 促进肾功能的恶化, DN 后期随钙化加重会导致血管顺应性下降,进一步影响肾小球的血流动力学,使病变继续恶化,最终不可避免进展到肾病终末期。而能否在发病早期阻断这一过程,可能为 DN 的防治提出新的思路。

参考文献:

- [1] Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2[J]. Clin Orthop, 1996, 324: 39.
- [2] Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells[J]. J Cell Biochem, 2003, 90: 756.
- [3] Fioretto P, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular structure in non- insulin - dependent diabetic patients with various Levels of albuminuria[J]. Diabetes, 1994, 43 : 13581.
- [4] Parhami F, Tintut Y, Patel J K, et al. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis[J]. Z Kardiol, 2001, 90 Suppl 3: 27.
- [5] Shioi A. Significance of vascular calcification in diabetic patients with increased risks of cardiovascular disease and stroke[J]. Clin Calcium, 2003, 13(9): 1132.
- [6] Mehrotra R, Budoff M, Christenson P, et al. Determinants of coronary artery calcification in diabetics with and without nephropathy[J]. Kidney Int, 2004, 66 (5): 2022.
- [7] Chen NX, Moe SM. Vascular calcification in chronic kidney disease[J]. Sem Nephrol, 2004, 24 (1): 61.
- [8] Chen D, Harris M, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 enhances BMP-3, BMP-4 and bone cell differentiation marker genes expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts[J]. Calcif tissue Int, 1997, 60(3): 283.

(收稿日期: 2010-05-28)

(上接第 3003 页)

据,并大胆猜测 XPD 基因在 TF II H 复合物中可能发挥着核心调节作用,其具体调节作用机制还有待于进一步研究探索。

参考文献:

- [1] Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, et al. A new, tenth subunit of TF II H is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A[J]. Nat Genet, 2004, 36(7): 714.
- [2] Vitorino S, Coin F, Zlobinskaya O, et al. Solution structure and self-association properties of the p8 TF II H subunit responsible for trichothiodystrophy[J]. J Mol Biol, 2007, 368(2): 473.
- [3] Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, et al. p8/TTD-A as a repair-specific TF II H subunit[J]. Mol Cell, 2006, 21 (2): 215.
- [4] Chiquancas D, Lima-Bessa KM, Starv A, et al. Defective transcription/repair factor II H recruitment to specific UV lesions in trichothiodystrophy syndrome[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6074.

- [5] Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases[J]. Genes Dev, 2001, 15(1): 15.
- [6] Aloyz R, Xu ZY, Bello V, et al. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TF II H subunit XPD[J]. Cancer Res, 2002, 62(19): 5457.
- [7] Giglia-Mari G, Mique C, Theil AF, et al. Dynamic interaction of TTD-A with TF II H is stabilized by nucleotide excision repair in living cells[J]. PLoS Biol, 2006, 4 (6): e156.
- [8] Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, et al. The XPB and XPD helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway[J]. Genes & Dev, 1996, 10: 1219.
- [9] Liu J, He L, Collins I, et al. The FBP interacting repressor targets TF II H to inhibit activated transcription[J]. Mol Cell, 2000, 5(2): 331.
- [10] Schmidt EV. The role of c-myc in cellular growth control [J]. Oncogene, 1999, 18(19): 2988.

(收稿日期: 2010-04-19 修回日期: 2010-05-06)