DOI:10.16016/j.1000-5404.202005002

Dickkopf 相关蛋白 1 对自发性高血压大鼠尿钠排泄的作用及机制

成方玲[1,2],王红勇[3],杨永健[1,2] 646000 四川 泸州,西南医科大学第一附属医院心血管内科[1];610083 成都,西部战区总医院心血管内科[2];400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院心血管内科[3]

[摘要] **目的** 探讨 Dickkopf 相关蛋白 1(Dickkopf-related protein 1,DKK1)在高血压中的作用及对尿钠排泄功能的影响。**方法** 8~10 周龄雄性正常血压大鼠(Wistar-Kyoto rats,WKYs;190~210 g)、雄性原发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHRs;190~210g) 各 12 只,采用 Western blot 检测 WKY 和 SHR 大鼠肾脏 DKK1 和 β-catenin 蛋白表达。采用完全随机的方法,将 12 只 WKY 大鼠分成 WKY+DKK1 组和 WKY 对照组(n=6)、12 只 SHR 大鼠分成 SHR+DKK1 组和 SHR 对照组(n=6);WKY+DKK1 组和 SHR+DKK1 组微泵泵注重组蛋白 DKK1[6 ng/(g·d)]。使用无创鼠尾测压仪测血压;代谢笼收集 24 h 尿量;计算 24 h 尿钠排泄情况,并用体质量校正。采用 Western blot 检测肾近端小管上皮(renal proximal tubule epithelial,RPT)细胞(WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞)内 DKK1 和 β-catenin 蛋白表达;重组蛋白 DKK1、DKK1 siRNA(siDKK1)和 β-catenin 信号抑制剂(inhibitor of β-catenin-responsive transcription,ICRT 14)、GSK3β 抑制剂(6-bromoindirubin-3′-oxime,BIO,)干预细胞后,检测 DKK1、β-catenin 表达或钠-钾-ATP 酶活性变化。**结果** SHR 大鼠肾脏 DKK1 表达水平较 WKY 大鼠低,而 β-catenin 升高(即 Wnt/β-catenin 激活);SHR+DKK1 组与 SHR 组相比,在埋泵术后第 2 周大鼠收缩压显著下降[(145.21±2.83)*vs* (156.07±3.08) mmHg,P<0.05],24 h 尿量增加[(37.40±3.76)*vs*(27.24±2.30)mL/kg,P<0.05],24 h 尿钠排泄增多[(0.79±0.09)*vs* (0.51±0.09)mmol/kg ,P<0.05]。WKY+DKK1 组与 WKY 组间差异均无统计学意义。SHR-RPT 细胞 DKK1 表达低于 WKY-RPT 细胞,而 β-catenin 升高;改变 DKK1 含量引起 β-catenin 改变(即 Wnt/β-catenin 通路活性改变)从而影响钠-钾-ATP 酶活性,且钠-钾-ATP 酶活性与 DKK1 呈负相关。**结论** DKK1 至少部分通过抑制 Wnt/β-catenin 通路降低钠-钾-ATP 酶活性,促进尿钠排泄降低血压。

[关键词] Dickkopf 相关蛋白 1;高血压;尿钠排泄;钠-钾-ATP 酶;Wnt/β-catenin;肾脏
[中图法分类号] R341;R363.22;R544.1 [文献标志码] A

Effect and mechanism of Dickkopf-related protein 1 on urinary sodium excretion in spontaneously hypertensive rats

CHENG Fangling[1,2], WANG Hongyong[3], YANG Yongjian[1,2] [1]Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]Department of Cardiology, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; [3]Department of Cardiology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of Dickkopf-related protein 1 (DKK1) in hypertension and its effect on urinary sodium excretion. **Methods** Twelve rats with normal blood pressure (Wister Kyoto rats, WKY), and 12 primary hypertension rats (spontaneously hypertensive rats, SHRs), all male, at an age of 8~10 weeks, weighing 190~210 g, were employed in this study. The expression of DKK1 and β-catenin in the kidney of WKY and SHR rats was detected by Western blotting. Then 12 WKY rats were randomly divided into WKY+DKK1 group and WKY control group (n=6), and so were the 12 SHR rats. Recombinant protein DKK 16 ng/(g·d) was pumped into the rats from the DKK1 groups *via* micro-syringe. The blood pressure of all the rats was measured by non-invasive tail-cuff method. And the urine was collected by metabolic cages for

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2015jcyjBX0129)
[通信作者] 杨永健,E-mail:yangyongjian38@yahoo.com

24-hour urinary volume and urinary sodium, which were adjusted with their weight. The expression of DKK1 and β-catenin protein in renal proximal tubule epithelial (RPT) cells (WKY-RPT and SHR-RPT) was detected by Western blotting. After intervention with recombinant protein DKK1, DKK1 siRNA (siDKK1), and β-catenin nuclear signal inhibitor (inhibitor of β-catenin-responsive transcription, ICRT 14), inhibitor of GSK3β (6-bromoindirubin-3′-oxime, BIO), the expression of DKK1 and β-catenin and the activity of Na^+-K^+-ATPase were measured. **Results** The expression level of DKK1 was lower, while that of β-catenin (indicating Wnt/β-catenin was activated) was higher in the renal tissue of SHR rats than of WKY rats. When the SHR+DKK1 group was compared with the SHR group, the systolic blood pressure was significantly decreased at 2 weeks after implantation (145.21±2.83 *vs* 156.07±3.08 mmHg, $P<0.05$), and both urine volume (37.40±3.76 *vs* 27.24±2.30 mL/kg, $P<0.05$) and urinary sodium excretion (0.79±0.09 *vs* 0.51±0.09 mmol/kg, $P<0.05$) within 24 h were increased. There were no significant differences in above indexes between WKY+DKK1 group and WKY group. The expression of DKK1 was lower in the SHR-RPT cells than the WKY-RPT cells, and that of β-catenin was opposite. Intervention of DKK1 expression would cause the change of β-catenin (indicating the alteration of Wnt/β-catenin pathway), and thus affect the activity of Na^+-K^+-ATPase, and the activity of Na^+-K^+-ATPase was negatively correlated with DKK1. **Conclusion** DKK1 can reduce Na^+-K^+-ATPase activity at least partially by inhibiting the Wnt/β-catenin pathway, promote urinary sodium excretion and lower blood pressure.

[**Key words**] Dickkopf-related protein 1; hypertension; urinary sodium excretion; Na^+-K^+-ATPase; Wnt/β-catenin; kidney

Supported by the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2015jcyjBX0129). Corresponding author: YANG Yongjian, E-mail: yangyongjian38@yahoo.com

《中国高血压防治指南(2018年修订版)》指出我国高血压的患病率仍呈升高趋势,中国高血压调查最新数据显示2012-2015中国成人高血压患病粗率为27.9[1]。早在1963年,BORST和BORST-DE GEUS就提出高血压是由于肾脏相对钠排泄减少引起的[2],GUYTON等[3]进一步指出血压的长期控制取决于肾脏钠排泄功能对体内钠含量的调控。且在遗传性高血压中,发现肾脏钠排泄缺陷是高血压发病机制的核心[4]。而肾近端小管上皮细胞是负责尿钠吸收的重要部位,钠重吸收是由钠-钾-ATP酶直接或间接驱动[5],钠-钾-ATP酶的活性受多种因子和通路的调节。研究显示钠-钾-ATP酶与Wnt/β-catenin信号之间存在密切联系[6],Wnt/β-catenin通路激活可增强钠-钾-ATP酶活性[7-8]。DKK1是Wnt/β-catenin信号通路的典型抑制剂,能与Wnt竞争性结合低密度脂蛋白相关蛋白5和6(LRP5/6),使GSK3β去磷酸化,从而阻止β-catenin细胞内积累,抑制Wnt/β-catenin信号通路。DKK1是一种低分子量可溶性分泌蛋白,表达于成骨细胞、骨细胞、皮肤、前列腺、胎盘、内皮细胞和肾脏组织等[9-10]。以往研究表明DKK1作为Wnt/β-catenin信号通路的典型抑制剂参与了多种疾病的发病机制[9]。DKK1是否也能通过Wnt/β-catenin信号通路调节肾小管上皮细胞的钠-钾-ATP酶活性而影响尿钠排泄?是一个值得研究的课题。因此,本研究探讨DKK1在高血压状态时以β-catenin依赖性方式调节肾小管上皮细胞的钠-钾-ATP酶活性影响尿钠排泄,并在血压调节中发挥作用,为临床高血压的控制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要器材及试剂

器材包括:无创鼠尾测压仪(北京softron公司),大鼠代谢笼(江苏赛昂斯公司),尿液分析仪(南京普郎医疗公司),手术器械盒、微量注射泵(浙江史密斯公司)。试剂包括:BCA蛋白浓度检测试剂盒(碧云天公司);超微量钠-钾-ATP酶检测试剂盒A070-2(南京建成生物技术公司),重组DKK1蛋白(recombinant human DKK1,rhDKK1;美国R&D Systems, Minneapolis, MN),兔抗DKK1抗体(英国abcam公司),兔抗β-catenin抗体(美国Cell Signaling Technology),鼠抗α-Tubulin抗体(中国,Proteintech Group),DKK1小干扰RNA(锐博生物),BIO(GSK3β Inhibitor XIX,美国Merck公司,是特异性GSK3β抑制剂,对GSK3β的IC_{50}=53 nmol/L,稳定β-catenin防止其磷酸化降解),ICRT 14(美国Abmole,ICRT 14是β-catenin反应性转录的有效抑制剂,在Wnt途径活性测定中,IC_{50}=40.3 nmol/L,直接影响核β-catenin与TCF4之间的相互作用)。DKK1定量PCR引物(正向序列:5′-GGATTCATGCTGGGATGCTG-3′;反向序列5′-AGGCCTTGTCACAT-

GATCCA-3′),GAPDH 定量 PCR 引物(正向序列:5′-AGGCCCCTCCTGTTGTTATG-3′;反向序列:5′-GGACCTCATGGCCTACATGG-3′),引物均由广东锐博生物合成。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物及处理 8~10 周龄雄性正常血压大鼠(Wistar-Kyoto,WKY)、雄性原发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHR)来自北京 Vital River 实验动物技术公司。2.5%戊巴比妥麻醉后,剔除脖颈处鼠毛,用皮肤剪横向剪开皮肤,约 2 cm 长,放入已注入配制好的重组 DKK1 蛋白溶液[6 ng/(g·d)]的微泵,缝合皮肤,待大鼠醒后放回笼中。时间 2 周,在埋泵前用无创鼠尾测压仪测量 1 次血压,记为 0 周。

1.2.2 无创鼠尾血压测量及 24 h 尿钠分析 分别在埋泵后 1、2 周测量血压和收集尿液。采用无创鼠尾测血压前,在安静环境下于 40 ℃条件预热大鼠 10 min;每只大鼠至少测量 5 次血压,两次测量至少间隔 2 min,取平均值为最终血压。将大鼠放入代谢笼,1 只/笼,在标准饲养环境下保证自由饮水和进食适应 1 d;在代谢笼开口内侧贴一薄层纱布过滤粪便,下方接 50 mL 离心管收集尿液;24 h 后收集离心管和尿液,并称量离心管;利用收集尿液前后离心管重量差值计算 24 h 尿量,尿液分析仪检测钠浓度计算 24 h 尿钠排泄情况,并用体质量校正。

1.2.3 组织免疫荧光染色 肾组织标本包埋浸蜡后置于冰上使其凝固。用切片机切为 4 μm 厚的组织切片,烘干备用。组织切片脱蜡水化后进行抗原修复。风干后抗原封闭 30 min,一抗孵育过夜(DKK1 抗体 1∶50)。PBS 冲洗后用二抗(1∶200 稀释)室温避光孵育 1 h。DAPI 染色液避光室温下孵育 5 min,PBS 冲洗后封片剂,采用荧光显微镜观察。

1.3 细胞处理

1.3.1 细胞培养 大鼠肾近端小管上皮细胞株(WKY-RPT 细胞株、SHR-RPT 细胞株均来自美国 Georgetown Washington 大学 Dr. Pedro A. Jose 实验室[25]),细胞培养采用 10%胎牛血清 DMEM/F-12 培养基并放在 37 ℃且含 5%CO_2 的细胞培养箱中培养。采用 siDKK1、重组蛋白 DKK1(400 ng/mL)、BIO(5 μmol/L)、ICRT 14(10^{-3} mmol/mL)处理细胞,用于进行钠-钾-ATP 酶活性检测或供提取蛋白以进行下一步实验。

1.3.2 siRNA 干扰实验 取无菌 1.5 mL EP 管加入 500 μL 的 Opti-MEM 培养基、60 nmol siRNA,室温放置 5 min。取另一离心管中加入相应量的脂质体 Lipofectamine™2000 稀释在 Opti-MEM 培养基中室温放置 5 min。混合以上含有 siRNA 和 Lipofectamine™2000 的培养基室温孵育 15 min。混合液加入细胞密度约 80%的细胞培养皿中,37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 6 h 后,换新鲜培养基,孵育 48~72 h。其中转染无关 siRNA 的细胞为 WKY 组和 SHR 组,转染靶向 DKK1 的 siRNA 细胞分组为 WKY+siDKK1 组和 SHR+siDKK1 组,转染靶向 DKK1 的 siRNA 细胞和加入 ICRT 14 组为 SHR+siDKK1+ICRT 14 组。

1.3.3 重组 DKK1 蛋白干预细胞 将 WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞前 1 d 传代至 6 孔板,待细胞密度为 60%~70%,培养基中加入重组 DKK1 蛋白至浓度为 400 ng/mL,37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 72 h。其中空白对照组为 WKY 组和 SHR 组,加入 DKK1 蛋白组为 WKY+DKK1 和 SHR+DKK1,同时加入 DKK1 蛋白和 BIO 组为 SHR+DKK1+BIO 组。

1.4 细胞及组织钠-钾-ATP 酶活性检测

1.4.1 细胞匀浆制备 将已完成预处理的 6 孔板中的培养基弃去,加入 1 mL 预冷的生理盐水并冲洗 3 次之后,在各孔中加入 1 mL 预冷的生理盐水冰上操作,刮脱细胞转移至 1.5 mL 离心管中。4 ℃离心 3 000 r/min×5 min,再清洗 3 次。弃上清加入约 500 μL 的低渗缓冲液(Tris HCl 10 mmol/L;EDTA 1 mmol/L pH=7.5),混匀,放置冰上使细胞充分裂解 5 min,4 ℃离心,15 000 r/min×6 min,在制备好的细胞匀浆中加入 250~350 mL 的 4 ℃生理盐水,使细胞膜蛋白浓度达到约 1 mg/mL。

1.4.2 肾组织匀浆制备 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠,取腰部切口切开皮肤和肌肉,迅速取出肾脏放入盛有生理盐水的培养皿中,在体视显微镜下除去包膜,取适量(0.1~0.2 g)肾皮质,在冰冷的生理盐水中漂洗除去血液,滤纸拭干准确称量,放入 5 mL 的匀浆管中。按质量(g)∶体积(mL)=1∶9的比例加入 9 倍体积的生理盐水于匀浆管中,冰水浴条件下,用眼科小剪尽快剪碎组织块。匀浆管将下端插入盛有冰水混合物的器皿中,将捣杆垂直插入套管中,上下转动研磨数至充分研碎,制成 10%的匀浆液。4 ℃,3 000 r/min 离心 10 min,取上清再用生理盐水按 1∶9稀释成 1%组织匀浆。

1.4.3 钠-钾-ATP 酶活性检测 超微量钠-钾-ATP 酶检测试剂盒检测钠-钾-ATP 酶活性,根据说明书操作步骤先进行酶促反应,所得溶液按 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液进行定磷,在 636 nm 处测各管光密度值 D(636),BCA 法测定蛋白浓度。规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位,即微摩尔磷/mg 蛋白/h[μmol/(mg·h)]。计算公式:ATPase 活力(U/mg)=[测定 D(636)-对照 D(636)]÷[标准 D(636)-空白 D(636)]×标准品浓度(0.02 μmol/mL)×6×7.8÷待测样本蛋白浓度(mg/mL)。

1.5 总 RNA 的提取和 RT-PCR 检测

用 TRIzol 试剂盒提取 RNA,核酸检测仪(Nanodrop2000)测光密度值。配置逆转录反应液:10 μL 的

RT 混合液,4 μL 的 5×PrimeScript Buffer,0.5 μL 的 RNase Inhibitor (40 U/μL),1 μL 的 PrimeScript RNAase(200 U/μL),4.5 μL 的无酶水,在 PCR 仪上进行逆转录反应:30 ℃(10 min),42 ℃(30 min),95 ℃(5 min),4 ℃保存。100 μL 无酶离心管中配制 RT-PCR 反应液(20 μL 体系):DEPC 水 7 μL,cDNA 1 μL,引物各 1 μL,SYBR 10 μL。在 12×8 PCR 反应管中加入上述混合液,各样本做 3 个复孔,以排除上样及系统误差。反应条件如下:PCR 起始激活阶段 95 ℃,3 min;三步循环反应:退火延长为 39 个循环:变性 95 ℃,10 s;退火 62 ℃,30 s;延长 72 ℃,30 s;Bio-Rad 系统软件自动获取 Ct 值并进行分析。

1.6　蛋白提取及免疫印迹法检测 DKK1 和 β-catenin 的表达

按蛋白提取试剂盒(碧云天)说明进行操作,提取 WKY 和 SHR 大鼠肾脏组织蛋白和细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,100 ℃煮 5 min。10% SDS-PAGE 电泳后转移至 NC 膜(Bio-Rad 公司,美国),再用 5%脱脂牛奶封闭 1h,分布孵育相应的一抗(DKK1 1∶500,β-catenin 1∶500,α-Tubulin 1∶500),4 ℃条件下,孵育过夜。次日取出膜复温后回收一抗,加入相应二抗(羊抗兔 1∶1 000)避光室温孵育 1 h,TBST 冲洗后使用荧光扫描仪对膜进行扫描,应用 Image J 软件定量分析。

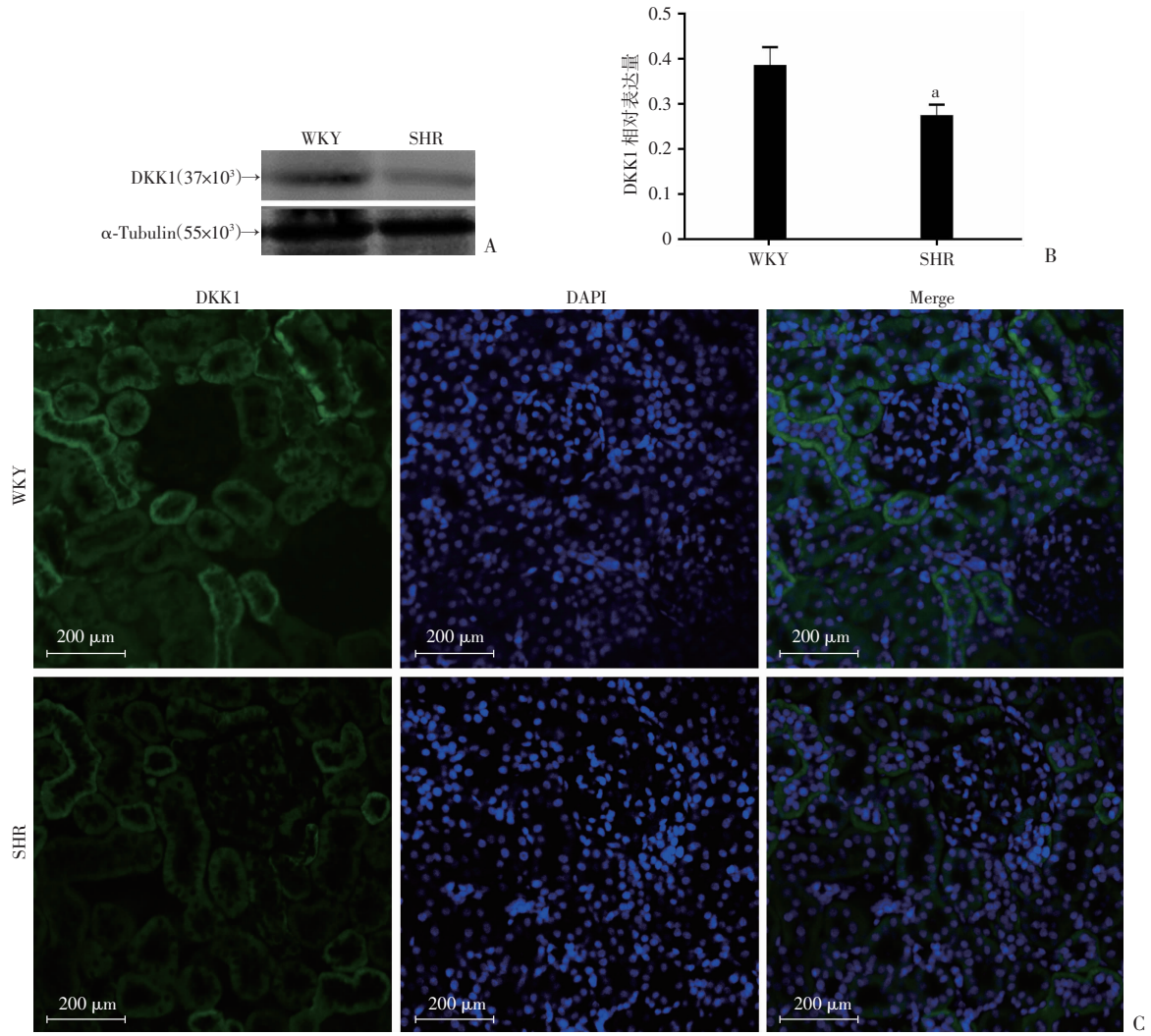
1.7　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 或百分表示,两组间比较采用 t 检验,组内使用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

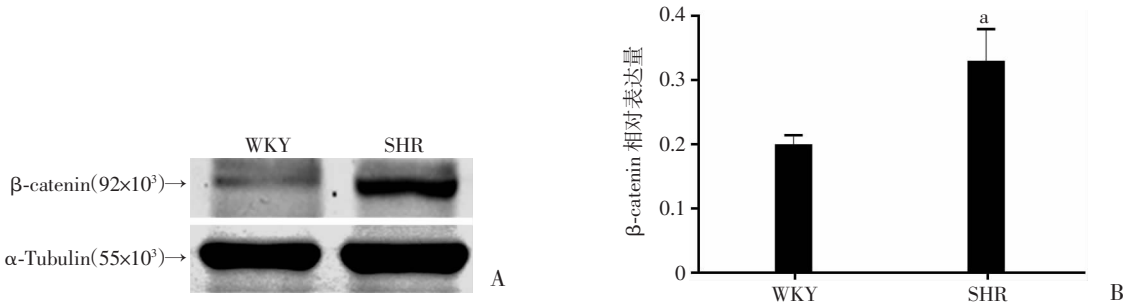
2.1　WKY 和 SHR 大鼠肾脏中 DKK1 的表达

Western blot 和免疫荧光检测结果显示:SHR 大鼠肾脏中 DKK1 表达低于 WKY 大鼠($P<0.05$,图 1)。而 Western blot 检测结果显示:SHR 大鼠肾脏中 β-catenin 表达高于 WKY 大鼠($P<0.05$,图 2)。



A:Western blot 检测结果; B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 WKY 大鼠比较;C:免疫荧光检测 DKK1 表达

图 1　Western blot 和免疫荧光检测 SHR 和 WKY 大鼠肾脏中 DKK1 的表达



A:Western blot 检测结果; B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 WKY 组比较

图 2　Western blot 检测 SHR 和 WKY 大鼠肾脏中 β-catenin 表达

2.2　DKK1 对 SHR 大鼠尿钠排泄及血压的影响

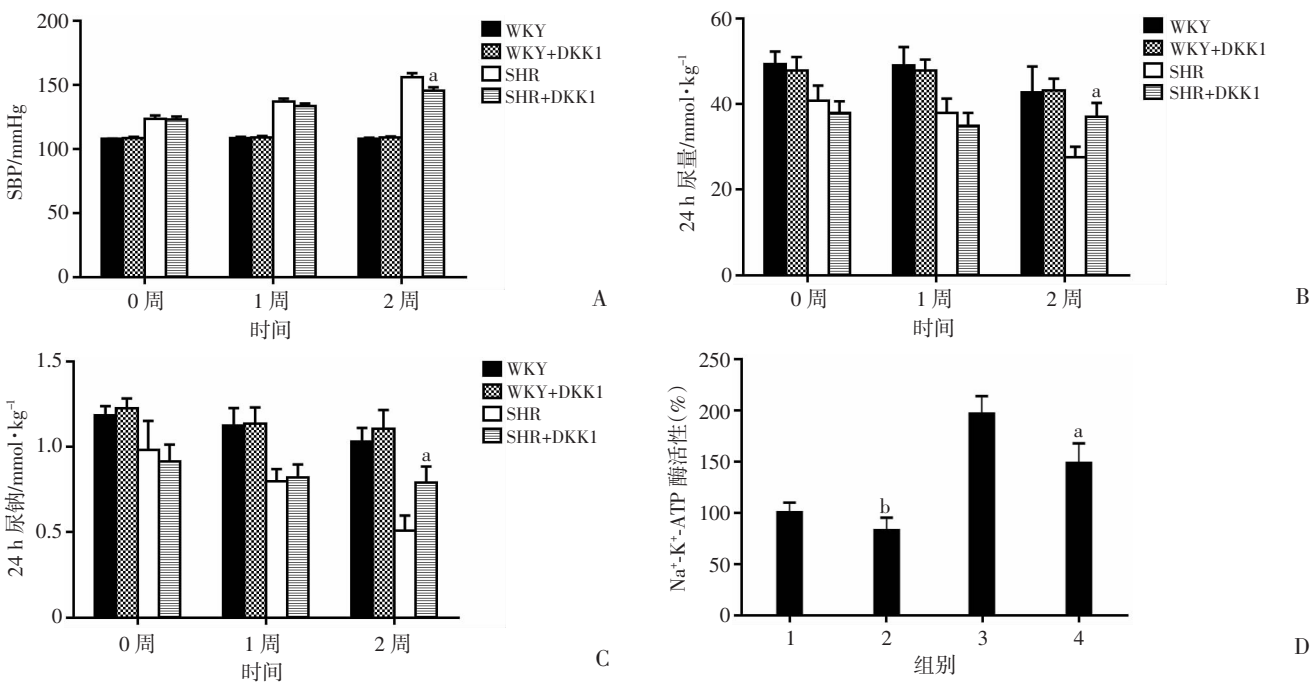
给予 WKY 和 SHR 大鼠外源性重组 DKK1 蛋白 2 周后,与 WKY 大鼠相比,SHR 大鼠收缩压降低(图 3A)、尿量增多(图 3B)、尿钠排泄增多(图 3C)。WKY 组与 WKY+DKK1 组间比较,尿钠虽有上升趋势,但差异无统计学意义(图 3C),收缩压和尿量差异无统计学意义(图 3A、B)。同时使用超微量 Na^+-K^+-ATP 酶检测试剂盒检测发现肾皮质钠-钾-ATP 酶活性降低(图 3D)。

2.3　外源性 DKK1 蛋白对钠-钾-ATP 酶活性的影响

Western blot 显示 SHR-RPT 细胞 DKK1 表达低于 WKY-RPT 细胞(图 4A、B)。在 WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞培养基中加入重组 DKK1 蛋白(400 ng/mL),发现钠-钾-ATP 酶活性明显降低(图 4C)。

2.4　降低 DKK1 表达对钠-钾-ATP 酶活性的影响

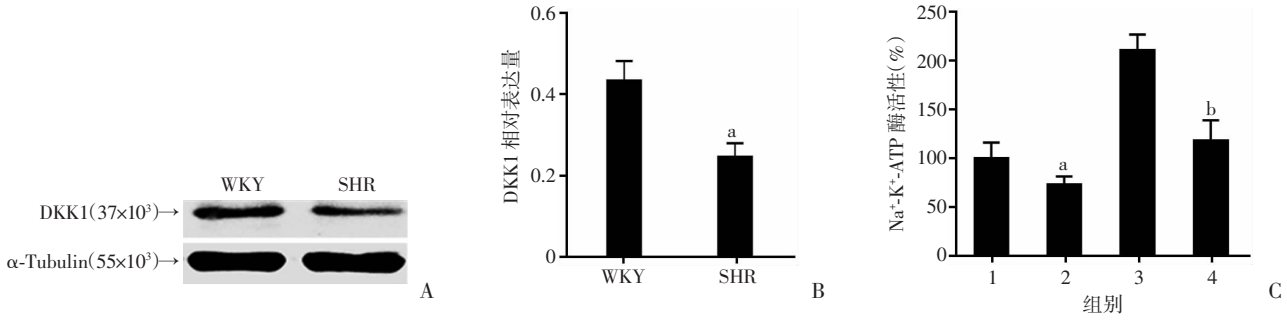
Western blot 和 RT-PCR 检测显示:siDKK1 干预细胞后,DKK1 表达下降(图 5A~E),检测钠-钾-ATP 酶活性发现 siDKK1 干预后钠-钾-ATP 酶活性升高(图 5F)。



1:WKY;2:WKY+DKK1;3:SHR;4:SHR+DKK1; a:$P<0.05$,与 SHR 比较;b:$P<0.05$,与 WKY 比较

A:收缩压(SBP);B:24 h 尿量;C:24 h 尿钠;D:WKY 和 SHR 大鼠肾组织钠-钾-ATP 酶活性

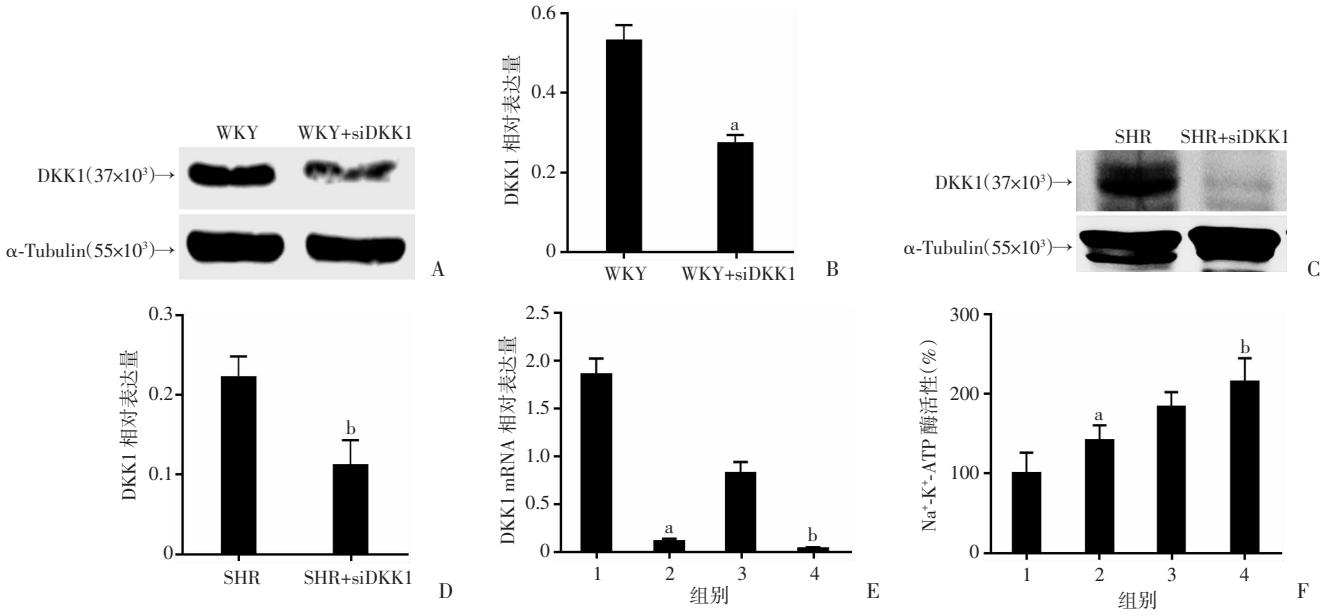
图 3　DKK1 对 SHR 大鼠收缩压、尿钠、尿量及肾钠-钾-ATP 酶活性的影响



1:WKY;2:WKY+DKK1;3:SHR;4:SHR+DKK1;a:$P<0.05$,与 WKY 比较;b:$P<0.05$,与 SHR 比较

A:Western blot 检测 WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞 DKK1 表达;B:半定量分析;C:WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞加入重组 DKK1 蛋白后钠-钾-ATP 酶活性

图 4 DKK1 蛋白对各组大鼠钠-钾-ATP 酶活性的影响



1:WKY;2:WKY+siDKK1;3:SHR;4:SHR+siDKK1; a:$P<0.05$,与 WKY 比较;b:$P<0.05$,与 SHR 比较

A~D:Western blot 检测 WKY(A、B)和 SHR(C、D)大鼠 siDKK1 干扰效率;E:RT-PCR 检测 siDKK1 干扰效率;F:超微量 Na^+-K^+-ATP 酶检测试剂盒检测 siDKK1 干扰后细胞钠-钾-ATP 酶活性

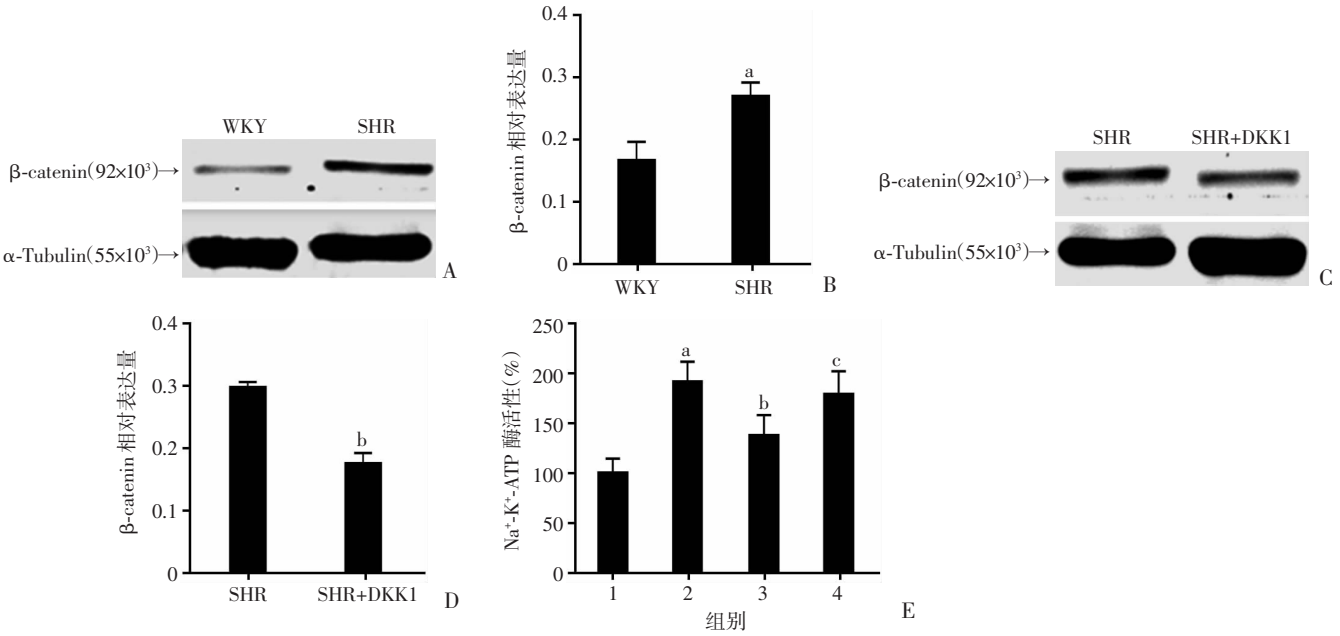
图 5 降低 DKK1 表达对钠-钾-ATP 酶活性的影响

2.5 DKK1 通过 β-catenin 调节钠-钾-ATP 酶活性

在 SHR-RTP 细胞观察到 β-catenin 表达高于 WKY-RPT 细胞(图 6A、B)。SHR-RPT 细胞外源性增加 DKK1 蛋白后,SHR-RPT 细胞 β-catenin 表达减少(图 6C、D,即抑制了 Wnt/β-catenin 信号通路),前面已证明 SHR-RPT 细胞外源加入 DKK1 蛋白能降低钠-钾-ATP 酶活性,加入 BIO 抑制 GSK3β(即激活 Wnt/β-catenin 信号)发现逆转 DKK1 蛋白引起的钠-钾-ATP 酶活性降低的现象(图 6E)。DKK1 可能是通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路降低钠-钾-ATP 酶活性。

2.6 DKK1 通过 Wnt/β-catenin 核转录信号调节钠-钾-ATP 酶活性

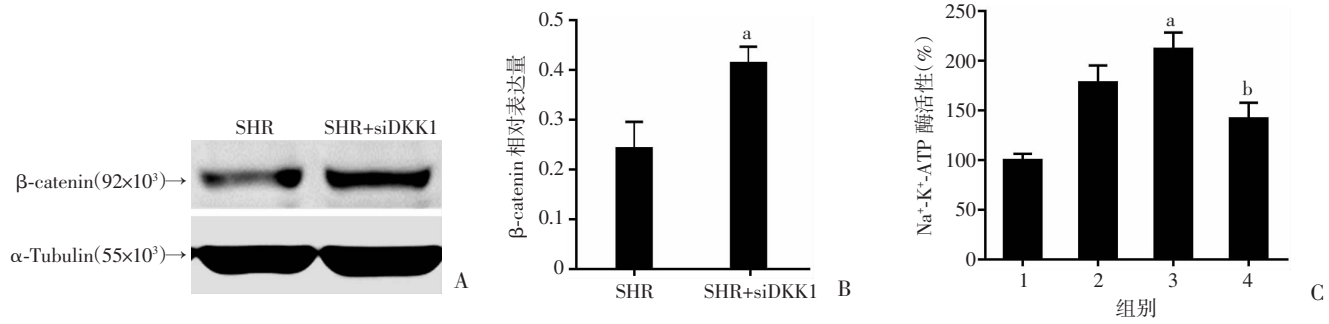
已证明 DKK1 调节 β-catenin 从而影响钠-钾-ATP 酶活性,为进一步明确 DKK1 通过 Wnt/β-catenin 信号传导通路调节钠-钾-ATP 酶活性,在 siDKK1 引起 β-catenin 表达升高(图 7A、B)、钠-钾-ATP 酶活性增加(图 5F)的情况下,观察抑制 β-catenin 核信号转录后对钠-钾-ATP 酶活性的影响。结果显示:SHR-RPT 细胞内 β-catenin 核转录抑制剂 ICRT 14 逆转了 siDKK1 引起的钠-钾-ATP 酶活性升高的现象(图 7C)。提示 DKK1 通过抑制 β-catenin 核信号转录,降低钠-钾-ATP 酶活性。



1:WKY;2:SHR;3:SHR+DKK1;4:SHR+DKK1+BIO; a:$P<0.05$,与 WKY 比较;b:$P<0.05$,与 SHR 比较;c:$P<0.05$,与 SHR+DKK1 比较

A、B:Western blot 检测 WKY-RPT 和 SHR-RPT 细胞 β-catenin 表达;C、D:Western blot 检测 SHR-RPT 细胞外源加入重组 DKK1 蛋白后 β-catenin 表达;E:检测 SHR-RPT 细胞分别加 DKK1 和 DKK1+BIO 后钠-钾-ATP 酶活性;BIO:GSK3β 特异性抑制剂

图 6 DKK1 通过 β-catenin 调节钠-钾-ATP 酶活性



1:WKY;2:SHR;3:SHR+siDKK1;4:SHR+siDKK1+ICRT 14;a:$P<0.05$,与 SHR 比较;b:$P<0.05$,与 SHR+siDKK1 比较

A、B:Western blot 检测 SHR-RPT 细胞加入 siDKK1 后 β-catenin 表达;C:SHR-RPT 细胞分别加入 siDKK1 和 siDKK1+ICRT 14 后钠-钾-ATP 酶活性;ICRT 14:β-catenin 核信号转录抑制剂

图 7 DKK1 调节 β-catenin 核转录影响钠-钾-ATP 酶活性

3 讨论

以往研究表明 Wnt/β-catenin 在高血压各相关疾病如心脏、血管重构、肾脏损伤等方面发挥重要调节作用,因此,Wnt/β-catenin 已被认为是高血压发生、发展的重要调节通路[11]。众所周知,DKK1 是 Wnt/β-catenin 的重要抑制剂,通过该通路参与了多种疾病的发生发展[9]。且以往研究表明在心血管相关疾病如冠心病、糖尿病心血管损害、肾病的患者血清或组织中 DKK1 蛋白水平显著改变[12-14]。因此,我们猜想 DKK1 在高血压中是否也通过 Wnt/β-catenin 通路参与了血压的调节。肾脏作为血压长期调节的重要调节器官,要求其必须根据 Na^+ 摄入量的变化而做出快速反应,以防止钠水潴留导致血压升高。临床和实验观

察均有力支持了肾脏在长期血压调节中的核心地位,并且发现各种形式的慢性高血压均对肾脏产生损害,出现肾脏尿钠排泄异常[15]。多项研究表明肾脏在受到各种各样的伤害刺激后可激活 Wnt/β-catenin 信号通路[16-18],包括高血压对肾脏的刺激作用,研究显示血管紧张素Ⅱ引起的高血压中 Wnt/β-catenin 信号被激活,并引起肾功能障碍,抑制 Wnt/β-catenin 后降低了高血压引起的蛋白尿、血清肌酐和尿素氮水平,且血压下降[18],说明 Wnt/β-catenin 信号通路是高血压与肾脏密切联系的纽带之一。肾脏对血压的调节主要取决肾小管上皮细胞对 Na^+ 重吸收强度,而这一过程由钠-钾-ATP 酶调控。已发现 Wnt/β-catenin 信号与钠-钾-ATP 酶之间可以相互调节[6-8,19],目前 Wnt/β-catenin 信号通路仍是 DKK1 发挥作用的主要通路,但 DKK1 对钠-钾-ATP 酶是否存在调节作用尚不清楚。

临床研究显示非肥胖高血压患者血清 DKK1 水平较血压正常者低[20],血清较低的 DKK1 水平可能与高血压相关。动物研究发现 SHR 大鼠体内 Wnt/β-catenin 被激活,并且出现心肌细胞内 DKK1 表达水平下降[21]。综上,我们使用 SHR 大鼠,观察 DKK1 是否在 SHR 大鼠肾脏中表达也发生改变,且是否能影响肾尿钠排泄功能和血压。结果显示:SHR 大鼠肾脏 DKK1 表达较 WKY 大鼠降低,而 β-catenin 趋势相反。证明 SHR 大鼠肾脏内 Wnt/β-catenin 信号活性增强。随后外源性加入重组人 DKK1 蛋白,观察到是否对尿钠和血压有影响,结果发现:SHR 大鼠泵入 DKK1 后与对照组相比,尿钠和尿量有较明显升高,且血压下降,

正常情况下,Wnt/β-catenin 未被激活时,β-catenin 如果不与细胞膜上钙粘蛋白(Cadherin)结合形成细胞间连接的组成部分,则会被激酶糖原合成酶激酶 3β(GSK3β)组成的复合物磷酸化从而降解。当 Wnt 蛋白与细胞膜受体结合激活信号通路后促进 GSK3β 磷酸化失活,β-catenin 得以在细胞质中积累,继而入核后参与转录调节。Wnt/β-catenin 通路能调节钠-钾-ATP 酶活性与 β-catenin 密切相关。β-catenin 作为 Wnt/β-catenin 信号传导的关键因子,近几年研究表明 β-catenin 可能从两方面调节钠-钾-ATP 酶活性:一是经 Wnt/β-catenin 通路,入核后与 TCF/LEFl 转录因子相互作用调节靶基因的转录,如研究表明在角膜内皮细胞中激活 Wnt/β-catenin 增加了其钠-钾-ATP 酶活性[22];二是直接作用,如研究发现 β-catenin 在非洲爪蟾卵母细胞中至少部分独立于 SGLT1 直接与钠-钾-ATP 酶相互作用[23]。另外,在大鼠肾近端小管上皮中 β-catenin 与 Catherine 共定位,当 β-catenin/Catherine 复合物的完整性被破坏后,引起钠-钾-ATP 酶细胞膜上的重新分布[16],但该文章未明确指出 β-catenin 是直接还是间接调节钠-钾-ATP 酶。因为 β-catenin/Catherine 复合物解离通常会导致 β-catenin 核信号传导的激活[19,24],因此 β-catenin/Catherine 复合物解离后,对肾小管上皮细胞钠-钾-ATP 酶的影响可能是直接作用,也可能是解离后的 β-catenin 进入细胞核通过转录调控调节钠-钾-ATP 酶。因为 DKK1 是 Wnt/β-catenin 信号通路的重要抑制剂,所以我们本研究更倾向于转录调节对钠-钾-ATP 酶的影响。因此,我们提出了这样一个假设:DKK1 在 Wnt 信号传导中以 β-catenin 依赖性方式调节肾小管上皮细胞的钠-钾-ATP 酶活性。

前面实验结果已显示 SHR 大鼠肾脏中 DKK1 表达下降而 β-catenin 水平增高。为验证以上假设,我们在 SHR-RPT 细胞培养基中外源加入重组人 DKK1 蛋白,发现 β-catenin 下降及钠-钾-ATP 酶活性降低,加入 BIO(GSK3β 抑制剂)激活 β-catenin 信号转录后,发现钠-钾-ATP 酶活性下降,表明 DKK1 能降低钠-钾-ATP 酶活性,且可能通过 Wnt/β-catenin 介导。为表明确实 DKK1 改变能引起 Wnt/β-catenin 改变而影响钠-钾-ATP 酶活性,在 SHR-RPT 细胞中降低 DKK1 的表达,观察到 β-catenin 增多(即 Wnt/β-catenin 激活)和钠-钾-ATP 酶活性升高,且在 SHR-RPT 细胞降低 DKK1 表达的情况下加入 ICRT14,抑制 β-catenin 核信号转录,逆转了之前降低 DKK1 后钠-钾-ATP 酶活性升高的现象。表明 DKK1 调节 β-catenin 核信号从而影响钠-钾-ATP 酶活性,也说明 DKK1 对血压的调节作用至少部分归功于其对肾脏尿钠排泄功能的调节。此外,因为钠-钾-ATP 酶活性是细胞极性的前提[18],且膜上 β-catenin 与 Wnt/β-catenin 通路之间可以相互调节[19,22],所以 DKK1/Wnt/β-catenin 降低钠-钾-ATP 酶活性时可能会引起 β-catenin/Catherine 复合物解离,改变 RPT 细胞膜钠-钾-ATP 酶分布,进一步破坏细胞极性和钠-钾-ATP 酶功能,导致细胞不能泵出多余的钠离子,从而影响 RPT 细胞内环境稳态,导致细胞损伤。研究表明 Wnt/β-catenin 在急性肾损伤中可根据时间不同,可呈现出相反的结果[18]。考虑到 DKK1 与

Wnt/β-catenin 信号的紧密关系,因此,高血压中 DKK1 是否也可能根据作用时间不同对 RPT 细胞功能促进或抑制? 而自发性高血压较低的 DKK1 水平是否是有利于机体在长期的高血压病程中缓解靶器官损伤的进程? 这些都需要更加系统的研究和更长的实验周期来证明。除此之外,实验中发现 WKY-RPT 细胞在加入重组 DKK1 蛋白后钠-钾-ATP 酶活性降低,而 WKY 大鼠却无显著变化,可能由于正常机体内 DKK1 稳态发生改变时,肾脏自身或与各器官系统相互调节,维持肾脏功能处于相对正常状态,即使短期内钠-钾-ATP 酶活性发生改变可能也无较明显的肾功能障碍表现,而在细胞实验中 WKY-RPT 细胞无其他外援,所以钠-钾-ATP 酶活性有较明显改变,WKY 肾皮质钠-钾-ATP 酶活性升高,也说明这种可能性。

本研究存在局限性,如实验周期较短,SHR 组与 SHR+DKK1 组血压差异不悬殊, WKY 组与 WKY+DKK1 组相比虽无差异,但 24 h 尿钠有升高趋势,也许更长期的实验周期可获得更明显的改变。此外还有一种可能,因为 DKK1 表达紊乱后涉及多系统及器官的 Wnt/β-catenin 信号传导的改变,且在不同器官系统中可能发挥不同功能,产生相反的调节效应。如在心肌细胞阻断 Wnt 信号通路后可抑制心肌细胞纤维化,而在血管系统中较高的 DKK1 可促进血管钙化。所以体内 DKK1 稳态改变对血压的调节可能是一个多系统参与的复杂的过程。最后,血压改变情况是综合调节后的结果,具体机制如何还需要进一步更加系统和完善的研究来证明。

综上所述,本研究结果提示:在自发性高血压大鼠中 DKK1 至少部分通过 Wnt/β-catenin 信号通路抑制肾小管钠-钾-ATP 酶活性,增加尿钠排泄,从而降低血压。

参考文献:

[1] 刘力生. 中国高血压防治指南(2018 年修订版)[J]. 中国心血管杂志,2019,24(1):24-56.
LIU L S. 2018 Chinese guidelines for the management of hypertension[J]. Chin J Cardiovas Med, 2019,24(01):24-56.

[2] BORST J G, BORST-DE GEUS A. Hypertension explained by Starling's theory of circulatory homoeostasis[J]. Lancet, 1963, 1(7283): 677-682. DOI:10.1016/s0140-6736(63)91443-0.

[3] GUYTON A C, COLEMAN T G, COWLEY A V Jr, *et al*. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension[J]. Am J Med, 1972, 52(5): 584-594. DOI:10.1016/0002-9343(72)90050-2.

[4] JOHNSON R J, LANASPA M A, GABRIELA SÁNCHEZ-LOZADA L, *et al*. The discovery of hypertension: evolving views on the role of the kidneys, and current hot topics[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(3): F167-F178. DOI:10.1152/ajprenal.00503.2014.

[5] CURTHOYS N P, MOE O W. Proximal tubule function and response to acidosis[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2014, 9(9): 1627-1638. DOI:10.2215/cjn.10391012.

[6] CASTILLO A,ORTUÑO-PINEDA C,FLORES-MALDONADO C, *et al*. Ouabain modulates the adherens junction in renal epithelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 52(6): 1381-1397. DOI:10.33594/000000097.

[7] HATOU S, YOSHIDA S, HIGA K, *et al*. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/β-catenin signaling[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(5): 828-839. DOI:10.1089/scd.2012.0286.

[8] LI B M, REN J A, YANG L, *et al*. Lithium inhibits GSK3β activity *via* two different signaling pathways in neurons after spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 848-856. DOI:10.1007/s11064-018-2488-9.

[9] HUANG Y, LIU L, LIU A G. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases[J]. Life Sci, 2018, 209: 249-254. DOI:10.1016/j.lfs.2018.08.019.

[10] HIRATA H, HINODA Y, NAKAJIMA K, *et al*. Wnt antagonist DKK1 Acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2011, 128(8): 1793-1803. DOI:10.1002/ijc.25507.

[11] ABOU ZIKI M D, MANI A. Wnt signaling, a novel pathway regulating blood pressure? State of the art review[J]. Atherosclerosis, 2017, 262: 171-178. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.001.

[12] UELAND T, ÅKERBLOM A, GHUKASYAN T, *et al*. Admission levels of DKK1 (dickkopf-1) are associated with future cardiovascular death in patients with acute coronary syndromes[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(2): 294-302. DOI:10.1161/ATVBAHA.118.311042.

[13] REGISTER T C, HRUSKA K A, DIVERS J, *et al*. Plasma Dickkopf1 (DKK1) concentrations negatively associate with atherosclerotic calcified plaque in African-Americans with

type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(1): E60-E65. DOI:10.1210/jc.2012-3038.

[14] THAMBIAH S, ROPLEKAR R, MANGHAT P, *et al*. Circulating sclerostin and Dickkopf-1 (DKK1) in predialysis chronic kidney disease (CKD): relationship with bone density and arterial stiffness[J]. Calcif Tissue Int, 2012, 90(6): 473-480. DOI:10.1007/s00223-012-9595-4.

[15] HALL J E, GRANGER J P, DO CARMO J M, *et al*. Hypertension: physiology and pathophysiology[J]. Compr Physiol, 2012, 2(4): 2393-2442. DOI:10.1002/cphy.c110058.

[16] JIANG J, DEAN, BURGHARDT R C, *et al*. Disruption of cadherin/catenin expression, localization, and interactions during HgCl2-induced nephrotoxicity[J]. Toxicol Sci, 2004, 80(1): 170-182. DOI:10.1093/toxsci/kfh143.

[17] WANG Y P, ZHOU C J, LIU Y H. Wnt signaling in kidney development and disease[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2018, 153: 181-207. DOI:10.1016/bs.pmbts.2017.11.019.

[18] XIAO L X, XU B, ZHOU L L, *et al*. Wnt/β-catenin regulates blood pressure and kidney injury in rats[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(6): 1313-1322. DOI:10.1016/j.bbadis.2019.01.027.

[19] CONTRERAS R G, FLORES-MALDONADO C, LÁZARO A, *et al*. Ouabain binding to Na+, K+-ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus[J]. J Membr Biol, 2004, 198(3): 147-158. DOI:10.1007/s00232-004-0670-2.

[20] CHEN K, ZHOU M D, WANG X M, *et al*. The role of myokines and adipokines in hypertension and hypertension-related complications[J]. Hypertens Res, 2019, 42(10): 1544-1551. DOI:10.1038/s41440-019-0266-y.

[21] SHAO S, CAI W W, SHENG J, *et al*. Role of SDF-1 and Wnt signaling pathway in the myocardial fibrosis of hypertensive rats[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(8): 1345-1356.

[22] HATOU S, YOSHIDA S, HIGA K, *et al*. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/β-catenin signaling[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(5): 828-839. DOI:10.1089/scd.2012.0286.

[23] SOPJANI M, ALESUTAN I, WILMES J, *et al*. Stimulation of Na+/K+ ATPase activity and Na+ coupled glucose transport by β-catenin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402(3): 467-470. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.10.049.

[24] MENG W X, TAKEICHI M. Adherens junction: molecular architecture and regulation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a002899. DOI:10.1101/cshperspect.a002899.

[25] 陈悦. 多巴胺D1类受体与胃泌素受体相互作用对胃-肾促尿钠排泄轴的影响[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.
CHEN Y. Effects of dopamine D1 receptor and gasatrin receptor interaction on the excretion axis of stomach-kidney sodium gonadotropin[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2014.

(**收稿**:2020-05-01;**修回**:2020-06-03)

(编辑 吴培红)