基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003661

Sp1/ABCA1信号通路在尿毒症动脉粥样硬化中的作用及其调节机制

黄宁川，马　辉，马　鹏
（贵州中医药大学第一附属医院肾内科，贵阳　550001）

【摘　要】目的：探讨特异性蛋白1（specificity protein 1，Sp1）/三磷酸腺苷结合盒转运蛋白A1（adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1，ABCA1）信号通路在尿毒症动脉粥样硬化中的作用及其调节机制。**方法：**小鼠血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）分为对照（Con）组、吲哚酚硫酸盐（indophenol sulfate，IS）组、IS+Sp1组和IS+Sp1+sh-ABCA1组。Con组用0.1%二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）处理24 h，其他组加入250 nmol/L IS处理24 h。通过蛋白质印迹分析和DiI标记氧化型低密度脂蛋白（DiI-labeled oxidized low density lipoprotein，DiI-ox-LDL）染色分析Sp1/ABCA1蛋白表达和脂质积聚情况。80只ApoE$^{-/-}$小鼠随机分为4组，假手术（Sham）组、尿毒症加速动脉粥样硬化（uremia accelerated atherosclerosis，UAAS）组、UAAS+Vector组、UAAS+Sp1组，每组20只。通过主动脉油红O染色（OilRedO，ORO）检测主动脉脂质情况。**结果：**IS浓度依赖性地促进细胞内DiI-ox-LDL荧光强度（P<0.001）。与IS组相比，IS+Sp1组细胞内DiI-ox-LDL荧光强度明显降低（P<0.001）。IS+Sp1+sh-ABCA1组细胞内DiI-ox-LDL荧光强度明显高于IS+Sp1组（P=0.015）。与Sham组相比，UAAS组、UAAS+Vector组主动脉和主动脉根、弓中ORO阳性面积明显增加（P<0.001），和主动脉窦组织中α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）与Sp1的共定位水平明显减少（P=0.002、0.005）。UAAS+Sp1组主动脉、主动脉根和弓中ORO阳性面积较UAAS+Vector组明显减少（P<0.001），和α-SMA与Sp1的共定位水平较UAAS+Vector组明显增加（P=0.008）。UAAS+Sp1组主动脉组织中Sp1和ABCA1蛋白表达水平明显高于UAAS+Vector组（P<0.001）。**结论：**尿毒症毒素IS可能通过抑制Sp1/ABCA1信号通路诱导VSMCs的脂质积聚，从而加速尿毒症内皮功能受损，促进动脉粥样硬化发展。

【关键词】特异性蛋白1；三磷酸腺苷结合盒转运蛋白A1；尿毒症；动脉粥样硬化；脂质
【中图分类号】R692　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-09-22

Role of Sp1/ABCA1 signaling pathway in uremic atherosclerosis and its regulatory mechanism

Huang Ningchuan，Ma Hui，Ma Peng
（*Department of Nephrology，The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the role of specificity protein 1（Sp1）/ATP-binding cassette transporter A1（ABCA1）signaling pathway in uremic atherosclerosis and its regulatory mechanism. ***Methods*：**Mouse vascular smooth muscle cells（VSMCs）were divided into control（Con）group，indophenol sulfate（IS）group，IS+Sp1 group，and IS+Sp1+sh-ABCA1 group. The Con group was treated with 0.1% DMSO for 24 h，while other groups were treated with 250 nmol/L IS for 24 h. The protein expression of Sp1/ABCA1 and lipid accumulation were analyzed by Western blot and Dil-labeled oxidized low-density lipoprotein（Dil-ox-LDL）staining. Eighty ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into four groups：sham group，uremia accelerated atherosclerosis（UAAS）group，UAAS+Vector group，and UAAS+Sp1 group，with 20 mice in each group. Aortic lipids were measured by oil red O（ORO）staining. ***Results*：**IS promoted the fluorescence intensity of intracellular DiI-ox-LDL in a concentration-dependent manner（P<0.05）. Compared with the IS group，the IS+Sp1 group had a significantly decreased fluorescence intensity of DiI-ox-LDL（P<0.01）. The fluorescence intensity of DiI-ox-LDL in the IS+Sp1+sh-ABCA1 group was significantly higher than that in the IS+Sp1 group（P<0.05）. Compared with the Sham group，the UAAS and UAAS+Vector groups had significantly increased ORO-positive areas in the aorta and aortic root and arch（P<0.05）and significantly reduced colocation levels of alpha-smooth muscle actin（α-SMA）and Sp1 in the aortic sinus tissue（P<0.05）. Compared with the UAAS+Vector group，the UAAS+Sp1 group had significantly reduced ORO-positive areas in the aorta and aortic root and arch（P<0.05）and significantly increased colocation levels of α-SMA and Sp1（P<0.05）. The protein expression levels of Sp1 and

作者介绍：黄宁川，Email：Toner200908@163.com，
研究方向：原发与继发性慢性肾脏病。
基金项目：贵州省卫生健康委员会科研计划资助项目（编号：WX2022P306）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241211.1635.004（2024-12-12）

ABCA1 in the aortic tissue of the UAAS+Sp1 group were significantly higher than those of the UAAS+Vector group（$P<0.05$）. ***Conclusion***: Uremic toxin IS may induce lipid accumulation in the VSMCs by inhibiting the Sp1/ABCA1 signaling pathway, thus accelerating endothelial dysfunction in uremia and promoting the progression of atherosclerosis.

【Key words】specificity protein 1; ATP-binding cassette transporter A1; uremia; atherosclerosis; lipid

动脉粥样硬化性心血管疾病是尿毒症患者心血管发病率和死亡率的主要原因[1]。尿毒症患者心血管疾病的高患病率可能导致灾难性的临床后果，如急性心肌梗死、心力衰竭和心脏骤停[2]。泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块的主要成分之一，血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）是泡沫细胞的主要来源[3]。来源于VSMCs的斑块细胞积极参与脂质摄取和加工，极大地促进了斑块核心的生成。有研究表明，尿毒症毒素，如对甲酚硫酸盐和吲哚酚硫酸盐（indoxyl sulfate，IS）被认为是动脉粥样硬化的独立危险因素[4]。虽然有研究报道了IS诱导的氧化应激、内皮功能障碍和VSMCs增殖也在动脉粥样硬化的发病机制中起重要作用[5]，但是关于IS是否加速动脉粥样硬化中脂质沉积仍然需要进一步阐明。作为一种具有锌指DNA结合结构域的原型转录因子，特异性蛋白1（specificity protein 1，Sp1）已经被确定为参与基因转录调节的重要因子[6]。已知Sp1通过与启动子区富含GC的元件结合来调节靶基因的基础和诱导型转录。研究证实，Sp1的激活是胆固醇流出所必需的。值得注意的是，最近研究发现IS在血液透析患者中的心血管靶蛋白包括Sp1[7]。因此，本研究旨在阐明Sp1在尿毒症动脉粥样硬化中的作用。这些发现旨在为尿毒症相关的脂质积聚提供新的见解，并为治疗尿毒症相关的心血管疾病提供一个新的潜在分子靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和分组

参照文献方法，通过酶消化C57BL/6小鼠的胸主动脉来制备小鼠VSMCs[8]，并维持在补充有10%胎牛血清（美国Gibco公司）的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基（美国Gibco公司）中。

为了测试IS对VSMCs的Sp1/三磷酸腺苷结合盒转运蛋白A1（adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1，ABCA1）蛋白表达、增殖和脂质积聚影响，将细胞以每孔5×10^3的密度接种到96孔板中，加入不同浓度IS（0～250 nmol/L；美国Sigma-Aldrich公司）孵育24 h，或用125 nmol/L IS孵育不同时间（0~36 h）。IS溶解在0.1%二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，美国Invitrogen公司），对照细胞用0.1% DMSO处理。

为了研究Sp1上调对IS诱导VSMCs功能改变的影响，将细胞分为对照（Con）组、IS组、IS+Sp1组和IS+Sp1+sh-ABCA1组。Con组用0.1% DMSO处理24 h，IS组加入250 nmol/L IS处理24 h，IS+Sp1组和IS+Sp1+sh-ABCA1组细胞在用IS处理前，使用Lipofectamine2000（美国Invitrogen公司）将Sp1过表达质粒和/或sh-ABCA1转染细胞48 h，然后将这些细胞与250 nmol/L IS一起孵育24 h。将Sp1序列克隆到pLent-Puro慢病毒载体（上海佰畔生物科技中心）中以构建过表达Sp1质粒。空载体（Vector）用作阴性对照。sh-ABCA1慢病毒和阴性对照（shNC）慢病毒由上海佰畔生物科技中心构建。sh-NC的序列为5′-CCGGCATTTCTCGAA ACGGTGACACGTTCGGAGAATTTTT-3′；sh-ABCA1-1的序列为5′-ATTTGTAGACTCTTTTGATCCCCCTTCAATTGAAGG GTTTTTTA-3′；sh-ABCA1-2的序列为5′-TTGAATCTCTCAC TCAGATTGCAAGTAGGATCTCGAGG-3′。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖试验 在5-乙炔基-2′-脱氧尿苷（5-ethynyl-2′-deoxyuridine，EdU）试验中，将细胞铺在12孔板中并转染。48 h后，进行EdU分析（上海Beyotime公司）以分析细胞增殖。细胞用10 μmol/L EdU溶液孵育2 h，用4%多聚甲醛固定，用0.5% TritonX-100洗涤1次。接下来，用100 μL1×DAPI溶液对细胞进行染色。用磷酸盐缓冲液（peptone buffered solution，PBS）洗涤3次后，从荧光显微镜获得图像并计算增殖率。

1.2.2 DiI标记氧化型低密度脂蛋白（DiI-labeled oxidized low density lipoprotein，DiI-ox-LDL）染色 通过DiI-ox-LDL（广州怡和生物科技有限公司）检测VSMCs对ox-LDL的摄取。将VSMCs与25 μmol/L DiI-ox-LDL在37 ℃孵育4 h。用PBS洗涤细胞3次后，用4%多聚甲醛固定细胞15 min，用4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（4′,6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）（上海Beyotime公司）将细胞核染色10 min。然后，使用倒置荧光显微镜观察细胞，并分析DiI荧光强度。

1.2.3 蛋白质印迹分析 在放射免疫沉淀试验裂解缓冲液（上海Beyotime公司）中裂解VSMCs和主动脉组织以提取细胞蛋白质。将等量的蛋白质加载到10% SDS-PAGE上，然后转移到PVDF膜上（美国Millipore Corporation公司）。在用5%脱脂乳封闭2 h后，将PVDF膜与针对Sp1（1∶8 000，美国Abcam公司）、ABCA1（1∶8 000，美国Abcam公司）和GAPDH（1∶5 000，美国Santa Cruz Biotechnology公司）的第一抗体在4 ℃孵育过夜，随后与辣根过氧化物酶缀合的第二抗体（1∶5 000，武汉三鹰生物技术有限公司）孵育。使用化学发光溶液（美国Thermo fisher Scientific公司）检测免疫反应性

蛋白质。

1.2.4 动物、实验步骤和饮食 本研究中使用的 $ApoE^{-/-}$小鼠为6~8周龄，体质量为20~25 g。80只雄性 $ApoE^{-/-}$小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号：SCXK（京）2021-0011]。动物饲养在一个12∶12 h光/暗循环和湿度、温度保持在55%、23 ℃的环境中，在金属饲养笼中自由获取食物和水。高脂肪饮食（40%脂肪，40%碳水化合物，20%蛋白质和1.25%胆固醇；D12108C）购自美国Research Diets公司。将80只 $ApoE^{-/-}$小鼠随机分为4组，每组20只：假手术（Sham）组、尿毒症加速动脉粥样硬化（uremia accelerated atherosclerosis，UAAS）组、UAAS+Vector组、UAAS+Sp1组。除Sham组外，其余组在异氟烷麻醉下分2步进行5/6肾切除术[9]。在手术过程中，小鼠在充满1.5%异氟醚[异氟醚在 O_2和 N_2（50%/50%）的混合物中，流速为0.9～1.0 L/min]的麻醉室中维持麻醉。在第一阶段，进行左侧切口，移除左肾囊以避免损伤输尿管和肾上腺，然后部分切除上下极。2周后，进行右侧切口和右肾切除术。Sham组在第一阶段进行左侧腹侧切口，然后在确定肾的上下极后关闭腹侧切口。2周后，进行右侧腹切口，然后在确定右肾动脉后关闭侧切口。肾切除术后2周采集血样，经血清尿素氮水平>20 mmol/L（Sham小鼠的血清尿素浓度为7~11 mmol/L）证实尿毒症模型建立成功。各组小鼠连续高脂肪饮食喂养14周，UAAS+Vector组和UAAS+Sp1组在第10周和第12周经尾静脉注射 5×10^8 pfu的Vector或Sp1过表达质粒。各组在最后一次喂食后2 h处死小鼠，以拔除眼球取血，将血液滴入含0.4 mL 4% EDTA-Na_2抗凝管中，250×g离心10 min，分离血清，分别标记好后于-20 ℃冰箱保存备用。

1.2.5 生化分析 通过7060型自动分析仪（日本日立公司）酶法测定血清总胆固醇（total cholesterol，TC）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）、甘油三酯（triglyceride，TG）、尿素氮和肌酐水平。

1.2.6 小鼠主动脉油红O染色（Oil Red O，ORO）评价 分离小鼠主动脉，10%福尔马林固定72 h。从主动脉根的心脏末端切下7 μm的连续冰冻切片。收集范围从主动脉小叶连合处向上覆盖主动脉根部490 μm长。通过ORO（美国Sigma公司）检测脂质。采用FSX100显微镜（日本Olympus公司）捕获切片图像，计算病变面积比，以百分比（%）表示。

1.2.7 免疫荧光染色 主动脉窦用OCT包埋并切片。载玻片在5%牛血清白蛋白中封闭30 min。主动脉切片与α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）和Sp1的一级抗体在4 ℃孵育过夜。用PBS冲洗后，将Alexa Fluor594缀合的山羊抗兔、Alexa Fluor 488缀合的山羊抗小鼠IgG或Alexa Fluor488缀合的山羊抗兔IgG在室温下孵育1 h。通过激光扫描显微镜（德国Carl-Zeiss公司）检测免疫荧光。

1.3 统计学方法

使用SPSS 21.0统计软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差分析，采用事后Dunnett检验进行两两比较，2组间比较采用双样本 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 IS影响VSMCs的增殖及脂质积聚

EdU分析表明，IS浓度依赖性地促进VSMCs增殖（F=24.860，P<0.001）（图1A）。通过观察VSMCs与DiI标记的oxLDL孵育后荧光信号的变化，发现IS浓度依赖性地促进细胞内DiI-ox-LDL荧光强度（F=48.530，P<0.001）（图1B）。对不同浓度IS处理24 h的VSMCs的蛋白质印迹分析表明，IS能促进VSMCs中Sp1、ABCA1蛋白表达，并在浓度为125 nmol/L时达到峰值，随后在250 nmol/L时降低（图1C）。用125 nmol/L IS处理不同时间显示，VSMCs中Sp1、ABCA1蛋白表达随IS刺激的时间增加而增加，并在24 h时达到峰值，随后在36 h时降低（图1D）。这些结果表明，IS调节VSMCs增殖和脂质积聚，可能机制为诱导Sp1/ABCA1信号通路异常。因此，研究选择250 nmol/L IS处理24 h作为后续研究浓度（图1E、1F）。

2.2 IS通过抑制Sp1/ABCA1信号通路促进脂质积聚

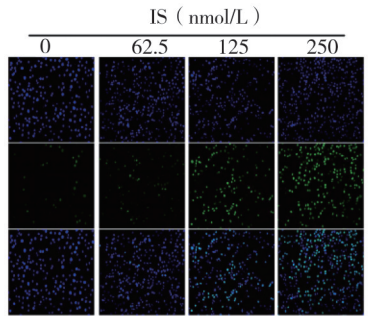
本研究进一步探讨Sp1/ABCA1信号通路是否参与了IS诱导脂质沉积的作用。如图2A所示，Sp1质粒可以逆转IS诱导的ABCA1表达下调，表明Sp1作为ABCA1的上游调节因子，可以促进ABCA1的表达。接下来，在VSMCs中使用慢病毒敲低ABCA1，并通过蛋白质印迹分析证实，发现ABCA1敲低不影响VSMCs中Sp1表达，支持Sp1作为ABCA1的上游调节因子（图2B）。DiI-ox-LDL染色测试的数据表明，各组细胞内DiI-ox-LDL荧光强度差异有统计学意义（F=122.400，P<0.001），与IS组相比，IS+Sp1组细胞内DiI-ox-LDL荧光强度降低（P<0.001）。IS+Sp1+sh-ABCA1组细胞内DiI-ox-LDL荧光强度高于IS+Sp1组（P=0.015）（图2C、2D）。这些结果表明IS可以通过抑制Sp1/ABCA1信号通路来促进血管平滑肌细胞的脂质积聚。

2.3 Sp1对UAAS小鼠体质量、血清生化和死亡率的影响

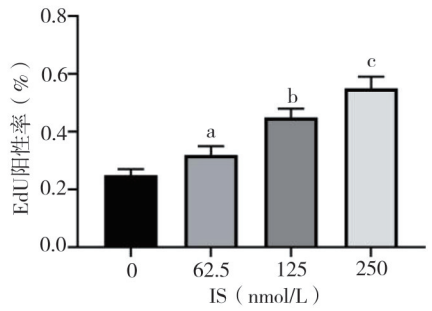
如表1所示，UAAS诱导2周后，UAAS小鼠体质量低于Sham组（F=5.460，P<0.05），而血清尿素氮和肌酐浓度高于Sham组（F=45.860、50.730，均P<0.001），且持续到实验结束，说明该模型是成功的。UAAS小鼠血清TC、TG、LDL-C均高于Sham组（P<0.05）。UAAS组、UAAS+Vector组和UAAS+Sp1组在体质量、血清尿素氮和肌酐浓度和TC、TG、LDL-C水平差异均无统计学意义。

2.4 Sp1对UAAS小鼠主动脉VSMCs中Sp1/ABCA1信号通路影响

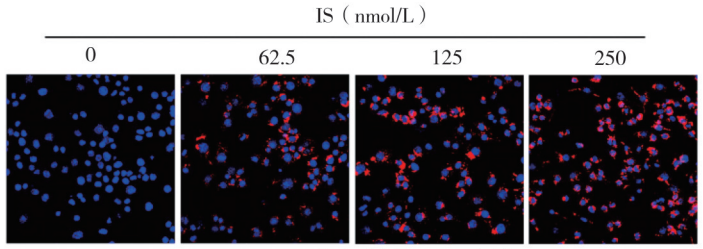
为了阐明Sp1是否参与UAAS小鼠主动脉VSMCs中的脂质积聚，采用双重免疫荧光染色法检测α-SMA和Sp1水平。各组主动脉窦组织中α-SMA和Sp1的共定位水平差异有统计学意义（F=104.300，P<0.001），与Sham组相比，UAAS组和UAAS+Vector组主动脉窦组织中α-SMA和Sp1的共定位水平减少（P=0.002、0.005）。UAAS+Sp1组主动脉窦组织中α-SMA和Sp1的共定位水平较UAAS+Vector组增加（P=0.008）。此外，通过蛋白质印迹证实UAAS+Sp1组主动脉组织中Sp1和ABCA1蛋白表达水平高于UAAS+Vector组（F=100.400、95.240，P<0.001）（图3）。



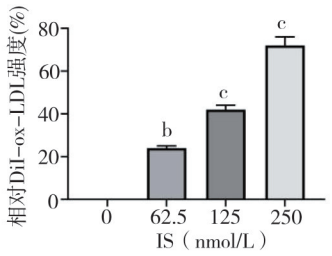
A. EdU分析VSMCs增殖情况



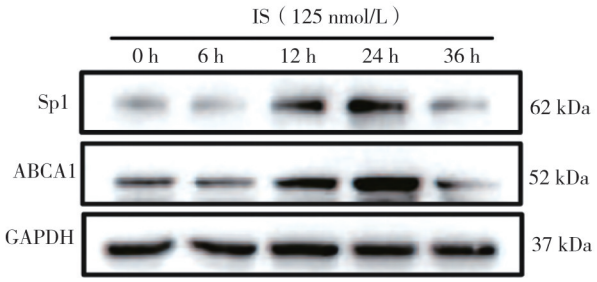
B. VSMCs增殖的定量分析



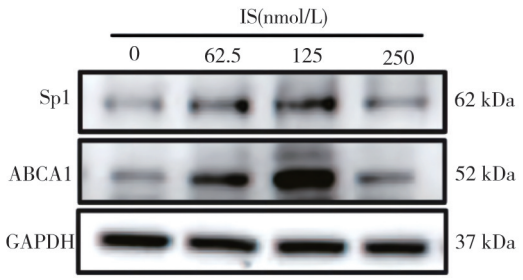
C. DiI-ox-LDL染色分析ox-LDL含量



D. ox-LDL含量的定量分析



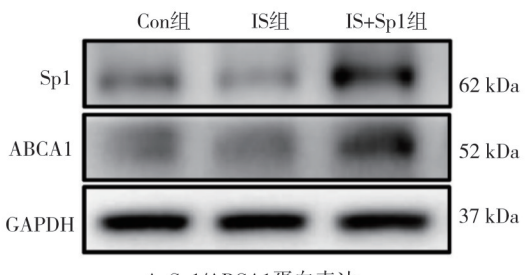
E. Sp1/ABCA1蛋白表达



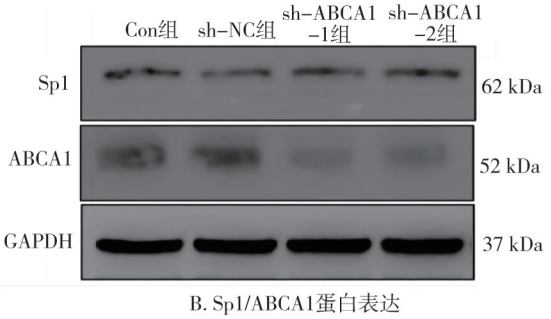
F. Sp1/ABCA1蛋白表达

注：a，与0 nmol/L相比，$P<0.05$；b，与0 nmol/L相比，$P<0.01$；c，与0 nmol/L相比，$P<0.001$

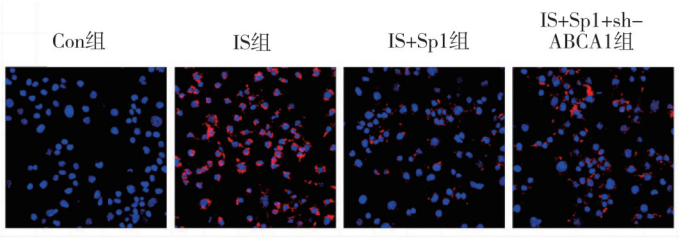
图1　IS对VSMCs的增殖、脂质积聚和Sp1/ABCA1蛋白表达影响



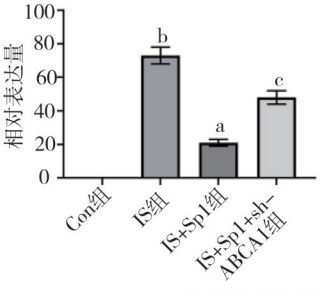
A. Sp1/ABCA1蛋白表达



B. Sp1/ABCA1蛋白表达



C. DiI-ox-LDL染色分析ox-LDL含量



D. ox-LDL含量的定量分析

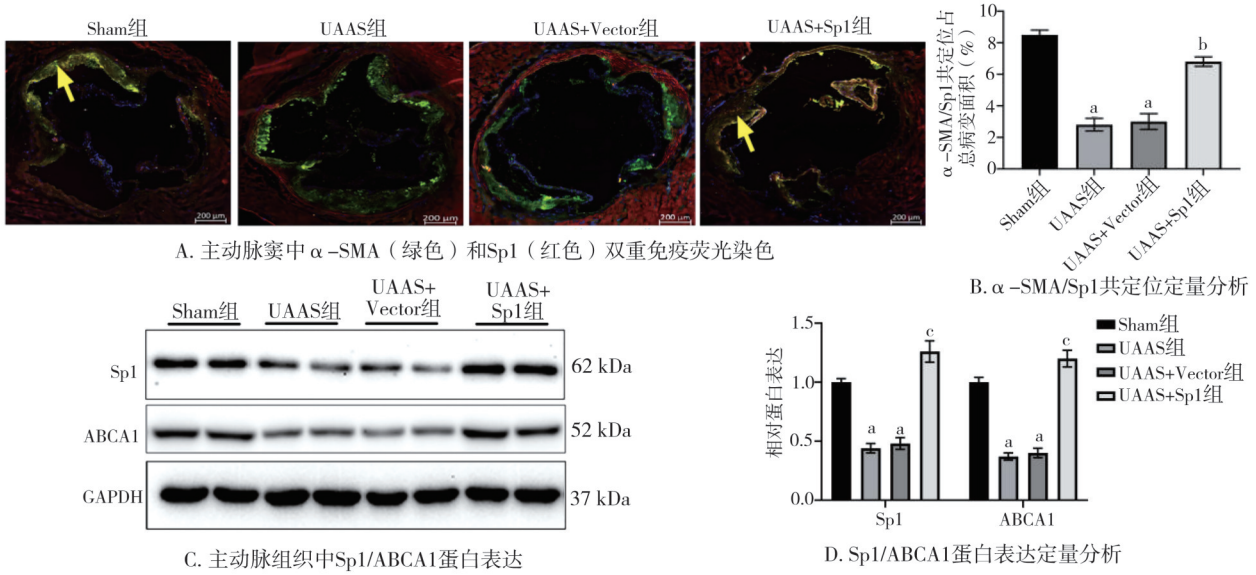
注：a，与Con组相比，$P<0.05$；b，与Con组相比，$P<0.01$；c，与IS组相比，$P<0.01$；d，与IS+Sp1组相比，$P<0.05$

图2　IS通过抑制Sp1/ABCA1信号通路促进脂质积聚

表1　Sp1对UAAS小鼠体质量、血清生化和死亡率的影响（$\bar{x}\pm s$；n，%）

项目	Sham组（n=19）	UAAS组（n=13）	UAAS+Vector组（n=14）	UAAS+Sp1组（n=14）
UAAS诱导前				
体质量（g）	22.94 ± 0.55	22.63 ± 0.60	22.44 ± 0.71	22.71 ± 0.65
UAAS诱导后2周				
体质量（g）	25.02 ± 0.77	22.66 ± 0.58[a]	22.28 ± 0.60[b]	22.13 ± 0.68[b]
尿素氮（mmol/L）	9.80 ± 0.92	25.44 ± 1.25[b]	25.62 ± 0.93[b]	25.69 ± 1.04[b]
肌酐（μmol/L）	8.48 ± 2.46	23.61 ± 1.49[a]	23.75 ± 1.14[a]	23.53 ± 1.33[a]
死亡率	0（0.00）	4（30.77）	4（28.57）	3（21.43）
UAAS诱导后10周				
体质量（g）	26.58 ± 0.65	25.24 ± 0.59	24.90 ± 0.67	25.16 ± 0.70
尿素氮（mmol/L）	11.04 ± 0.79	27.62 ± 0.81[b]	26.67 ± 1.03[b]	27.49 ± 0.96[b]
肌酐（μmol/L）	9.15 ± 0.85	20.32 ± 1.20[b]	19.73 ± 1.04[b]	18.85 ± 0.93[b]
TC（mmol/L）	11.83 ± 0.77	14.55 ± 1.02[a]	14.41 ± 0.89[a]	14.50 ± 0.92[a]
TG（mmol/L）	0.87 ± 0.08	1.12 ± 0.05[b]	1.14 ± 0.07[b]	1.12 ± 0.04[b]
LDL-C（mmol/L）	4.59 ± 0.48	6.84 ± 0.36[b]	6.64 ± 0.33[b]	6.70 ± 0.38[b]
死亡率	1（5.26）	2（15.38）	1（7.14）	2（14.29）
UAAS诱导后14周				
体质量（g）	27.22 ± 0.68	25.83 ± 0.65	25.52 ± 0.59	25.71 ± 0.62
尿素氮（mmol/L）	11.04 ± 0.79	27.10 ± 0.92[b]	26.43 ± 0.84[b]	26.65 ± 0.90[b]
肌酐（μmol/L）	9.52 ± 0.92	21.54 ± 1.05[b]	20.32 ± 0.94[b]	20.85 ± 0.93[b]
TC（mmol/L）	11.95 ± 0.71	14.66 ± 1.10[a]	14.71 ± 0.95[a]	14.59 ± 0.99[a]
TG（mmol/L）	0.94 ± 0.11	1.16 ± 0.05[b]	1.19 ± 0.06[b]	1.13 ± 0.04[b]
LDL-C（mmol/L）	4.64 ± 0.47	6.83 ± 0.35[b]	6.62 ± 0.33[b]	6.68 ± 0.39[b]
死亡率	0（0.00）	1（7.69）	1（7.14）	1（7.14）

注：a，与Sham组比较，P<0.05，b，与Sham组比较，P<0.01



A. 主动脉窦中α-SMA（绿色）和Sp1（红色）双重免疫荧光染色

B. α-SMA/Sp1共定位定量分析

C. 主动脉组织中Sp1/ABCA1蛋白表达

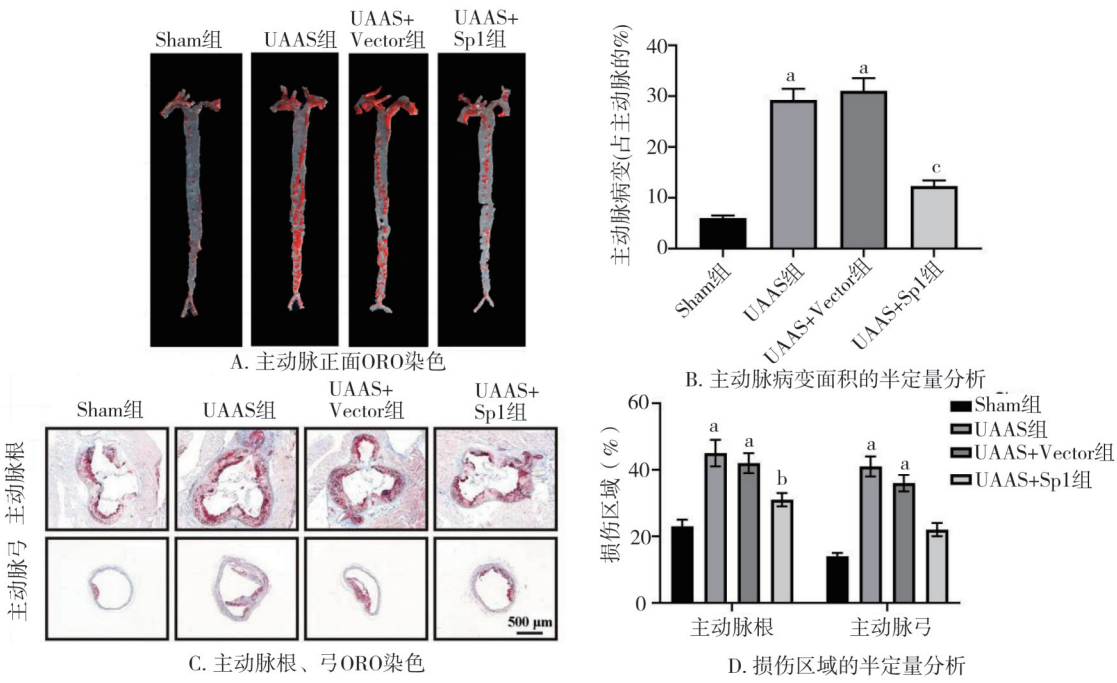
D. Sp1/ABCA1蛋白表达定量分析

注：黄色箭头表示双色染色；a，与Con组比较，P<0.05；b，与Con组比较，P<0.01；c，与IS组比较，P<0.01；d，与IS+Sp1组比较，P<0.05

图3　Sp1对UAAS小鼠主动脉VSMCs中Sp1/ABCA1信号通路影响

2.5　Sp1对UAAS小鼠动脉粥样硬化的疗效

ORO染色的主动脉表面显微照片显示，各组主动脉、主动脉根和弓中ORO阳性面积差异有统计学意义（F=105.000、56.540、41.820，均 P<0.001）。与Sham组相比，UAAS组和UAAS+Vector组主动脉、主动脉根和弓中ORO阳性面积增加（P<0.001）。UAAS+Sp1组主动脉和主动脉根、弓中ORO阳性面积较UAAS+Vector组减少（P<0.001）（图4）。



注：a，与Sham组比较，$P<0.001$；b，与UAAS组相比，$P<0.05$；c，与UAAS组相比，$P<0.01$

图4　Sp1对UAAS小鼠动脉粥样硬化的疗效

3　讨　论

IS是一种典型的蛋白结合性尿毒症毒素，在肾功能减退患者的血液和组织中蓄积。与健康人群的0.1~39 μmol/L相比，晚期CKD患者的总硫酸吲哚酚浓度超过500 μmol/L[10]。值得注意的是，循环中IS水平的升高可发生在轻度CKD中[11]。IS显示出强烈的剂量依赖性促纤维化和促肥大作用，而其他蛋白结合的尿毒症毒素，包括对甲酚硫酸盐、对甲酚、间甲酚、间甲酚硫酸盐和苯乙酸，作用很小或没有作用。来自临床和试验研究的新证据表明，IS在CKD患者中观察到的CVD进展中发挥作用，这可能通过增强心肌和脉管系统中的氧化应激来发挥作用[12]。因此，IS对心血管系统的影响可以部分解释CKD患者的高心血管风险。尿毒症患者的内皮功能受损，这可能与整个疾病过程中尿毒症毒素（如IS）的累积有关[2]。研究发现，IS通过诱导促炎分子的表达、增加氧化应激、降低细胞活力和导致内皮屏障完整性丧失而对内皮细胞产生负面影响[13]。动脉粥样硬化是一种慢性脂质驱动的炎症性疾病。动脉粥样硬化的早期特征是血管内皮功能障碍。VSMCs从中膜迁移到内膜，这不仅促进纤维帽的形成，而且通过摄入修饰的低密度脂蛋白和脂滴的积累，有助于泡沫细胞的形成，从而进一步加速斑块的发展和成熟。最终，斑块破裂导致血管内血栓形成[14]。大量研究表明，VSMCs是人类和ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化中大多数泡沫细胞的来源，ABCA1在这2个物种的内膜VSMCs中表达较低[15]。在这项研究中，本研究数据显示了Sp1/ABCA1相关信号在尿毒症动脉粥样硬化发病机制中的作用。首先，本研究体外分析发现，IS可以抑制Sp1/ABCA1信号并促进VSMCs增殖和脂质积聚。此外，本研究的功能获得和功能丧失研究表明，Sp1上调能明显减少IS诱导的VSMCs中的脂质积聚，而ABCA1敲低则逆转了这一活性作用。因此，Sp1/ABCA1信号对于IS诱导的VSMCs脂质积聚是必不可少的。

ApoE$^{-/-}$小鼠倾向于在标准食物饮食中自发形成动脉粥样硬化病变，是目前用于研究动脉粥样硬化最流行和最方便的小鼠模型[16]。已证实，慢性肾脏疾病与深度血管重塑相关，其特征为内膜增生、动脉粥样硬化加速、过度血管钙化和血管僵硬[12]。ApoE$^{-/-}$小鼠是实验性动脉粥样硬化研究的优秀模型。研究表明，在5/6肾切除术后，尿毒症加速了ApoE$^{-/-}$小鼠的动脉粥样硬化和动脉钙化[5]。慢性肾脏疾病中的尿毒症毒素积聚会诱发炎症、氧化应激和内皮功能障碍，这是动脉粥样硬化的关键步骤[17]。这项研究使用ApoE$^{-/-}$小鼠建立UAAS模型，结果显示UAAS模型小鼠的Scr、BUN、TC、TG和LDL-C水平较Sham小鼠升高，证明5/6肾切除可以诱导肾衰竭，并且用高脂肪饮食喂养的小鼠可以进一步加速尿毒症小鼠的动脉粥样硬化进展。当ApoE$^{-/-}$小鼠经历UAAS发展时，主动脉α-SMA和Sp1的共定位

水平明显降低，提示 VSMCs 中 Sp1 表达明显降低，表明 Sp1 的下调可能促进了动脉粥样硬化的进展。

随着 ABCA1 参与胆固醇在细胞和细胞外受体之间移动的蛋白质的鉴定，对质膜、膜筏和介导胆固醇流出的蛋白质的富含胆固醇的结构域的理解大大增加[18]。已经证实 ABCA1 对巨噬细胞的胆固醇流出具有积极作用[19]。转录因子 Sp1 被认为是 ABCA1 表达的调节因子。作为 Sp/Kruppel 转录因子家族的成员，Sp1 参与了对多种细胞信号的基因反式激活，这些基因与各种基本的生物过程有关，如细胞生长、分化和发病机制[20]。PI3K 和 PKCζ 介导的 Sp1 磷酸化的增强通过增加 Sp1 与 ABCA1 启动子的结合来促进 ABCA1 的表达[21]。络丝蛋白是极低密度脂蛋白受体和载脂蛋白 E 受体-2 的配体。含有 reelin 第 5 和第 6 重复的络丝蛋白亚区多肽 R5-6 通过增加 ABCA1 的表达促进胆固醇流出[22]。本研究通过尾静脉施用 Sp1 过表达质粒以上调 UAAS 小鼠主动脉中 Sp1/ABCA1 信号通路，并发现主动脉中脂质积聚的病变面积减少，表明 Sp1/ABCA1 通过介导脂质积聚参与尿毒症动脉粥样硬化的发病机制。

总之，本研究表明，尿毒症毒素 IS 可能通过抑制 Sp1/ABCA1 信号通路诱导 VSMCs 的脂质积聚，从而加速尿毒症内皮功能受损，促进动脉粥样硬化发展。这些发现可能加深人们对尿毒症动脉粥样硬化的理解。然而，本研究没有阐明 Sp1/ABCA1 信号通路诱导 VSMCs 的脂质积聚的详细分子机制。未来的研究需要确定 Sp1/ABCA1 激动剂对尿毒症动脉粥样硬化的治疗效果。

参 考 文 献

[1] Lu XX, Li H, Wang SX. Hydrogen sulfide protects against uremic accelerated atherosclerosis via nPKCδ/akt signal pathway[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7: 615816.

[2] Harlacher E, Wollenhaupt J, Baaten CCFMJ, et al. Impact of uremic toxins on endothelial dysfunction in chronic kidney disease: a systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(1): 531.

[3] 庄文雯，杨咏琪，李洪亮，等. 动脉粥样硬化过程中核因子 E2 相关因子 2 对血管平滑肌细胞的调控作用[J]. 浙江大学学报(医学版)，2021，50(3)：390-395.
Zhuang WW, Yang YQ, Li HL, et al. Regulatory effect of nuclear factor E2-related factor 2 on vascular smooth muscle cells during atherosclerosis [J]. J Zhejiang University (Medical Edition), 2021, 50(3): 390-395.

[4] Lano G, Burtey S, Sallée M. Indoxyl sulfate, a uremic endotheliotoxin[J]. Toxins, 2020, 12(4): 229.

[5] Chen WJ, Lai YJ, Lee JL, et al. CREB/ATF3 signaling mediates indoxyl sulfate-induced vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in uremia[J]. Atherosclerosis, 2020, 315: 43-54.

[6] Wang QQ, Tian JJ, Li X, et al. Upregulation of endothelial DKK1 (dickkopf 1) promotes the development of pulmonary hypertension through the Sp1 (specificity protein 1)/SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2) pathway[J]. Hypertension, 2022, 79(5): 960-973.

[7] Wu PH, Lin YT, Chiu YW, et al. The relationship of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate with target cardiovascular proteins in hemodialysis patients[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 3786.

[8] 陈 琳，程玲霞，杨 帆，等. 血管平滑肌细胞自噬对小鼠主动脉夹层形成的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版)，2021，42(2)：226-234.
Chen L, Cheng LX, Yang F, et al. Impact of autophagy in vascular smooth muscle cells on mouse aortic dissection[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2021, 42(2): 226-234.

[9] Radloff J, Latic N, Pfeiffenberger U, et al. A phosphate and calcium-enriched diet promotes progression of 5/6-nephrectomy-induced chronic kidney disease in C57BL/6 mice[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14868.

[10] Lim YJ, Sidor NA, Tonial NC, et al. Uremic toxins in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic targets[J]. Toxins, 2021, 13(2): 142.

[11] Daneshamouz S, Eduok U, Abdelrasoul A, et al. Protein-bound uremic toxins (PBUTs) in chronic kidney disease (CKD) patients: production pathway, challenges and recent advances in renal PBUTs clearance[J]. NanoImpact, 2021, 21: 100299.

[12] Yu HB, Zhou CY, Hu DY, et al. Uremic toxin indoxyl sulfate induces dysfunction of vascular smooth muscle cells via integrin-β1/ERK signaling pathway[J]. Clin Exp Nephrol, 2022, 26(7): 640-648.

[13] Li XW, Lu ZB, Zhou FH, et al. Indoxyl sulfate promotes the atherosclerosis through up-regulating the miR-34a expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells *in vitro*[J]. Vascul Pharmacol, 2020, 131: 106763.

[14] Chen MY, Zhang ZH, Ke JF, et al. Chaetocin attenuates atherosclerosis progression and inhibits vascular smooth muscle cell phenotype switching[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2022, 15(6): 1270-1282.

[15] Rickel AP, Sanyour HJ, Kinser C, et al. Exploring the difference in the mechanics of vascular smooth muscle cells from wild-type and apolipoprotein-E knockout mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 323(5): C1393-C1401.

[16] Wang Y, Dubland JA, Allahverdian S, et al. Smooth muscle cells contribute the majority of foam cells in ApoE (apolipoprotein E)-deficient mouse atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(5): 876-887.

[17] Rodrigues SD, Santos SS, Meireles T, et al. Uremic toxins promote accumulation of oxidized protein and increased sensitivity to hydrogen peroxide in endothelial cells by impairing the autophagic flux[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(1): 123-129.

[18] Karpouzas GA, Papotti B, Ormseth SR, et al. ATP-binding cassette G1 membrane transporter-mediated cholesterol efflux capacity influences coronary atherosclerosis and cardiovascular risk in Rheumatoid Arthritis[J]. J Autoimmun, 2023, 136: 103029.

[19] Kuusisto S, Karjalainen MK, Tillin T, et al. Genetic and observational evidence: No independent role for cholesterol efflux over static high-density lipoprotein concentration measures in coronary heart disease risk assessment[J]. J Intern Med, 2022, 292(1): 146-153.

[20] Jiang JF, Zhou ZY, Liu YZ, et al. Role of Sp1 in atherosclerosis[J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 9893-9902.

[21] Kuang HJ, Zhao GJ, Chen WJ, et al. Hsp27 promotes ABCA1 expression and cholesterol efflux through the PI3K/PKCζ/Sp1 pathway in THP-1 macrophages[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 810: 57-62.

[22] Okoro EU, Zhang HF, Guo ZM, et al. A subregion of reelin suppresses lipoprotein-induced cholesterol accumulation in macrophages [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136895.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

黄宁川，马 辉，马 鹏. Sp1/ABCA1 信号通路在尿毒症动脉粥样硬化中的作用及其调节机制[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(6)：808-814.