

糖尿病肾病^的 分子机制与干预

Molecular Mechanisms and
Interventions of Diabetic Nephropathy

谢 曦 黄河清 编著



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

糖尿病肾病 的 分子机制与干预

Molecular Mechanisms and
Interventions of Diabetic Nephropathy

谢 曦 黄河清 编著



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

· 广州 ·

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

糖尿病肾病的分子机制与干预/谢曦, 黄河清编著. —广州: 中山大学出版社, 2016. 4

ISBN 978 - 7 - 306 - 05644 - 3

I. ①糖… II. ①谢… ②黄… III. ①糖尿病肾病—分子机制—干预
IV. ①R692

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 052429 号

糖尿病 肾病的分子机制与干预

Tangniaobing Shenbing de Fenzi Jizhi yu Ganyu

出 版 人: 徐 劲

策划编辑: 曾育林

责任编辑: 曾育林

封面设计: 曾 斌

责任校对: 马霄行

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84111996, 84113349, 84111997, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275

传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 广东省农垦总局印刷厂

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 10 印张 200 千字

版次印次: 2016 年 4 月第 1 版 2016 年 4 月第 1 次印刷

定 价: 30.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换



前 言

糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症，而肾脏纤维化是糖尿病肾病的重要病理机制，是导致终末期肾衰竭的主要原因，危害严重。本书主要总结了国内外医药科研工作者通过一系列的研究所揭示的糖尿病肾病的分子病理机制，以及现有的和开发中的临床治疗药物。希望通过我们的整理综述，能为从事糖尿病肾病相关研究的科研工作者提供有意义的研究参考。

本书分上、中、下三编，在上编、中编除了整理他人的研究成果以外，还集中展示了我们课题组近十年来在肾病方面的部分研究成果，包括糖尿病肾病的分子机制研究和药物干预研究两个部分的研究内容。重点对 RhoA/ROCK 信号通路和细胞缝隙连接蛋白 connexin 43 在糖尿病肾脏纤维化中的介导作用研究进行了介绍，并且在此基础上探索了虎杖苷和黄连素对实验性糖尿病肾病的治疗作用，结果发现二者对实验性糖尿病肾脏纤维化都有较好的治疗效果。希望通过对我们科研成果的展示，为治疗糖尿病肾病药物的研究开发提供有价值的实验依据或为其他药学或医学科研工作者提供有意义的参考。在文章的下编部分，我们对糖尿病肾病患者的饮食治疗也做了相应介绍，希望对于没有专业研究背景的普通读者或者是糖尿病肾病患者也能提供积极的参考。

本书中他人研究成果都已注明出处，所展示的实验研究成果主要是谢曦博士等课题组成员在中山大学药学院、中山大学实验动物中心完成的。谢曦博士现就职于海南大学海洋学院，为此书的完成倾注了大量的心血，在书稿完成之际，由衷感谢谢曦博士所作出的



辛勤努力。对课题组成员兰天博士、刘慰华博士、黄凯鹏博士、王金平硕士、李学娟硕士、姜琴硕士、李文渊硕士、章小燕硕士、彭晶硕士、郝洁硕士及其他同学所作出的系列研究工作表示衷心的感谢！对药理毒理实验室刘培庆教授、沈晓燕教授及其他老师所给予的指导、帮助表示衷心的感谢！同时对海南大学海洋学院所给予的支持表示衷心的感谢！

中山大学药学院 黄河清

2015 年 10 月



目 录

上编 糖尿病肾病分子机制研究

第一章 糖尿病肾病的分子机制研究进展综述	2
第二章 介导糖尿病肾病的信号通路研究	9
第一节 RhoA/ROCK 信号通路在糖尿病肾病中的介导作用研究	9
一、研究背景介绍	9
二、研究结果	10
三、研究讨论	19
第二节 细胞缝隙连接蛋白 connexin 43 在糖尿病肾病中的介导作用研究	22
一、研究背景介绍	22
二、研究结果	25
三、研究讨论	33
第三节 RhoA/ROCK 信号通路通过调控 connexin 43 介导糖尿病肾病的 研究	39
一、研究背景介绍	39
二、研究结果	40
三、研究讨论	48

中编 抗糖尿病肾病药效研究

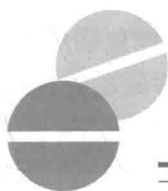
第三章 糖尿病肾病药物治疗现状和展望	54
第一节 降糖药物与影响肾素-血管紧张素系统的药物	55
一、血糖控制的药物	55
二、以肾素-血管紧张素-醛固酮系统为靶点的治疗药物	55
第二节 抗氧化药物	55
一、维生素 C 和维生素 E	55
二、干预 Nrf2 的治疗	56



第三节 抗炎症药物	57
一、抑制 NF- κ B	57
二、环氧合酶抑制剂	57
三、PPAR- γ 激动剂	58
四、其他抗炎药物	58
第四节 糖尿病肾病治疗药物展望——新型的糖尿病治疗药物	59
一、GLP-1	59
二、DPP-IV 抑制剂	60
三、SGLT-2 抑制剂	60
第四章 抗糖尿病肾病药物干预研究	62
第一节 虎杖苷对高糖培养的肾小球系膜细胞 fibronectin 及 NF- κ B 炎症 信号通路的影响	62
一、研究背景介绍	62
二、研究结果	63
三、研究讨论	72
第二节 黄连素通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路改善实验性糖尿病肾病	76
一、研究背景介绍	76
二、研究结果	77
三、研究讨论	86

下编 糖尿病肾病饮食治疗

第五章 糖尿病肾病食疗介绍	90
附录 本研究中使用的实验方法	105
参考文献	119



上编 糖尿病肾病分子机制研究

- 第一章 糖尿病肾病的分子机制研究进展综述
- 第二章 介导糖尿病肾病的信号通路研究



第一章 糖尿病肾病的分子机制 研究进展综述

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病严重的慢性微血管并发症, 肾小球硬化症和间质纤维化是其主要病理特征之一, 在临床上具有较高的致死致残率。世界卫生组织 (WHO) 预计, 到 2030 年, 糖尿病患者将从 2010 年的 2.85 亿人增至 4.39 亿人, 临床上超过 1/3 的糖尿病患者伴有糖尿病肾病的发生, 最终发展为肾衰竭^[1,2]。终末期肾脏衰竭患者行健康肾脏移植可在一定时期内维持肾脏健康功能, 但在糖尿病背景下, 肾衰还会再次出现, 在肾源短缺和移植费用较高的情况下, 大部分患者无法行肾脏移植, 因此, 终末期肾脏病便成为糖尿病致死致残的重要因素^[3]。因此, 针对糖尿病肾病发病机制研究以及开发治疗糖尿病肾病药物的研究, 已经成为国内外医药领域研究的热点。

糖尿病肾病早期表现为肾小球滤过率增高, 微量白蛋白尿, 肾小球肥大和肾小球基底膜增厚, 继而出现肾小球系膜细胞外基质扩展、肾小球硬化和间质纤维化, 最终慢慢演变为肾脏衰竭。糖尿病肾病的主要病理表现为肾脏肥大, 肾小球和肾小管基底膜增厚, 足细胞丢失, 肾小球血管系膜区扩张, 以及纤维连接蛋白 (fibronectin) 和 IV 型胶原 (collagen IV) 等细胞外基质蛋白过度分泌沉积, 导致弥漫性或节结性肾小球硬化, 合并肾小管间质的纤维化, 最终出现蛋白尿、肾脏功能衰竭等功能紊乱。肾小球系膜细胞 (GMCs) 过度增殖及纤维化成分过度表达在糖尿病肾病的病理进程中起着关键作用^[4-6]。

糖尿病肾病发病机制复杂, 高血糖是糖尿病初始致病因子, 在血流动力学和代谢因子的相互作用下该并发症形成, 并且该并发症的形成与遗传和环境因素也有密切关系^[7,8]。目前的研究普遍认为, 在长期高血糖作用下, 可以通过氧化应激^[9]、糖基化终末产物 (AGEs) 积聚^[10]、肾素-血管紧张素-醛固酮系统异常^[11]、炎症以及纤维化信号通路的激活等机制诱导糖尿病肾病的形成^[6,12]。

(1) 肾脏氧化应激增加。活性氧簇 (ROS) 是一类氧衍生的具有较强化学活性的分子, 包括超氧阴离子、过氧化氢等, 具有未配对电子的原子或原



子团。氧化应激的产生是由于活性氧簇的量超过氧化剂清道夫的含量以及 NADPH/NADP⁺ 比例的异常。在高血糖的环境下,葡萄糖激活肾脏细胞内的醛糖还原酶和多元醇通路,下调 NADPH/NADP⁺ 的比例。血糖水平增加通过诱导产生新合成的二酰基甘油激活了蛋白激酶 C(PKC),PKC 激活线粒体内的 NADPH 氧化酶进而诱导氧化应激的增加,促进肾小球系膜区的扩张和基底膜的增厚,并介导内皮细胞功能的紊乱^[13]。许多研究表明糖尿病状态下氧衍生的自由基含量增加,增加的活性氧簇和抗氧化剂的减少会对细胞组分造成损害^[14]。活性氧簇的产生会导致肾脏足细胞中细胞外基质和纤维化因子的累加,损害足细胞^[15]。NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶和微粒体酶都参与了氧自由基的形成过程。其中,NADPH 氧化酶被认为是调控活性氧产生的最重要的酶,葡萄糖和自由脂肪酸的代谢异常通过线粒体途径激活 NADPH 氧化酶,进而激活蛋白激酶 C,从而诱导氧化剂的过量产生^[16]。Nox4 为肾脏组织里主要表达的 NADPH 氧化酶,研究发现高糖条件下 Nox4 在肾脏组织的表达增加,并且介导了肾脏肥大和纤维连接蛋白表达的增加^[17]。Nox4 的基因敲除鼠在糖尿病状态下,由高糖诱导的足细胞丢失现象可被缓解^[18]。Nox4 的抑制剂可以独立于血糖调控而缓解 *db/db* 糖尿病小鼠的肾病症状^[19]。大量的研究证实,糖尿病肾脏组织中活性氧的产生增加,并且糖尿病患者以及糖尿病动物模型血液中 8-羟基脱氧鸟嘌呤、异前列腺素和脂质过氧化物的含量明显增加^[13,20-23]。胰岛素抵抗背景下可形成过多的游离脂肪酸,这些游离脂肪酸通过线粒体代谢的 β 氧化磷酸化可诱导氧化剂的产生^[24]。啮齿类动物实验显示,氧化应激的增加与糖尿病肾病的病理进程关系密切,阻断多元醇通路或使用醛糖还原酶抑制剂可以减少高血糖对糖尿病肾脏的影响。高剂量的维生素 E 可以通过抗氧化有效缓解糖尿病啮齿类动物模型的肾脏病理变化^[25]。

糖尿病状态下,肾脏中的活性氧增多的同时,抗氧化应激保护系统,如 Nrf2/ARE 信号通路的活性受到一定程度抑制,氧化应激和抗氧化应激的失衡诱导了上皮细胞的损伤以及 GMCs 过度合成纤维化成分^[26]。Nrf2 是调控细胞内源性和外源性应激的适应性反应的转录因子,通过影响一系列级联通路调控有毒物质的去毒并发挥维持细胞氧化还原稳态的功能^[27]。激活的 Nrf2 可以抑制人微血管内皮细胞中高糖诱导的活性氧的增加以及代谢功能的失调^[28]。动物实验表明,激活肾脏组织的 Nrf2 可以改善氧化应激损伤、蛋白尿、肾脏肥大、细胞外基质增加以及基底膜增厚^[29]。Keap1 是 Nrf2 的胞浆抑制蛋白,临床实验报道,keap1 抑制剂 bardoxolonemethyl,通过与 keap1 相互作用,促进 Nrf2 的入核,发挥抗氧化和抗炎作用,糖尿病肾病患者使



用甲基巴多索隆 (bardoxolone methyl) 52 周后, 与安慰剂相比, 能有效改善糖尿病肾脏功能。不幸的是, 由于过高的死亡率, 该化合物未能通过 3 期临床试验^[30,31]。

(2) 糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 积聚^[32]。糖基化终末产物是指在非酶促条件下, 蛋白质、氨基酸、脂类或核酸等大分子物质的游离氨基与还原糖的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生的一组稳定的终末产物^[7]。AGEs 的形成, 改变了蛋白的功能, 同时通过与 AGEs 受体 (RAGE) 相互作用, 诱导肾脏细胞的病理反应。在糖尿病状态下, 肾脏组织中 AGEs 含量明显增加。AGEs 在肾脏的累积分布, 与糖尿病肾病的病理进程有一定相关性。体外实验结果显示, 在有或无高糖刺激的情况下, AGEs 都能剂量和时间依赖性地促进细胞外基质成分如纤维连接蛋白、I 型和 IV 型胶原表达的增加^[33]。AGEs 作为糖尿病肾病的致病物质, 可以激活肾小管上皮细胞中的 NF- κ B, 激活肾小球系膜细胞中的 TGF- β -Smad 信号通路^[34,35]。可溶的 AGEs 能够诱导体外培养的人肾小球系膜细胞 GTGF 和纤维连接蛋白的表达^[36]。AGEs 的形成可以通过与其受体 RAGE 相互作用诱导肾脏足细胞中单核趋化蛋白-1 (MCP-1) 的表达, 并且诱导足细胞中活性氧的过量产生, 从而损害足细胞^[37]。在糖尿病肾病进程中, AGEs 可以通过诱导肾脏细胞外基质合成和降解之间失衡, 导致胶原、纤维连接蛋白和层粘连蛋白的过度累积, 促进肾脏纤维化的形成^[38]。糖化胶原形成后, 在分子内部或分子间交联, 会导致组织结构的变化, 包括组装密度表面电位的异常, 并且表现为硬度增加、热学稳定性降低, 并且抵抗蛋白水解消化作用^[39]。不同基质分子之间的相互作用也可能被 AGEs 修饰所破坏, 层粘连蛋白和纤连蛋白与胶原 4 和肝素蛋白多糖之间的亲和性在其被 AGEs 修饰后大大降低^[40]。糖化作用还能抑制 IV 型胶原和层粘连蛋白分子之间的自身聚合反应。

上述这些改变较明显地出现在肾小球基底膜, 该部位的胺类的化学交联导致蛋白通透性的增加, 可能诱导蛋白尿的出现^[41]。敲除 RAGE 后, 糖尿病肾病进程被明显延缓^[42]。糖尿病性的 RAGE 敲除小鼠表现出蛋白尿、高滤过率、肾小球硬化、线粒体和细胞中的超氧化物增加这些肾病现象明显缓解^[43]。大部分 AGE 的抑制剂都能通过下调氧化应激、减少活性氧的产生而缓解糖尿病肾病症状^[44]。相关研究还提示, AGEs 和 RAS 之间存在相互作用, 血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素受体抑制剂都可减少 AGE 的产生^[45], 普伐他汀被证实可以通过抑制 RAGE 的表达, 进而抑制 AGEs 诱导的凋亡和肾小管细胞中不对称二甲基精氨酸 (一种内源性的一氧化氮合酶抑制剂) 的产生, 提示 AGE 抑制剂和 RAS 抑制剂的联合使用可以产生协同作用, 对抗糖尿病肾病^[46]。



(3) 慢性炎症。虽然传统观念认为代谢异常和血流动力学异常是糖尿病肾病的主要诱因,但是越来越多的证据显示炎症过程和免疫细胞都在一定程度上参与了糖尿病肾病的病理进程^[47,48]。免疫系统的异常和慢性炎症在糖尿病并发症,包括糖尿病肾病的病理进程中发挥了重要作用。糖尿病状态下的代谢因素、生化因素、血流动力学因素以及精神问题都可能成为炎症的诱因^[13]。

相当多的研究提示,细胞因子、趋化因子、生长因子、黏附分子、核因子以及免疫细胞都参与了糖尿病肾病的病理进程^[49,50]。巨噬细胞被认为是导致肾脏损害的主要炎症细胞之一,其在肾脏组织的浸润聚集与糖尿病肾病的严重程度相关,高血糖诱导巨噬细胞产生趋化因子,进而细胞产生干扰素- γ ^[51]。研究发现,在糖尿病患者血液中干扰素- γ 的含量高于正常人,干扰素- γ 通过免疫反应对糖尿病肾病进程产生促进作用^[52,53]。DM状态下,体内高血糖^[54]、糖基化蛋白终产物(AGEs)^[55]、氧化应激^[56,57]、蛋白尿^[58]、内皮素-1^[55]、血管紧张素受体II(Ang II)^[59,60]等均可激活NF- κ B。NF- κ B被持续过度地激活或表达后,可上调前炎症介质/炎症介质以及相关酶类,引起大量的炎性细胞积聚浸润,导致炎症反应持续并加重^[61,62]。体内研究发现,DN患者肾皮质的肾小管内皮细胞、肾小球足细胞及内皮细胞中MCP-1等蛋白随NF- κ B的激活呈依赖性表达增加^[63]。糖尿病肾病患者的末梢血单核细胞的NF- κ B DNA的结合活性高于无肾脏并发症的糖尿病患者,且这种结合活性的增强与蛋白尿浓度相关^[57]。肾小球细胞外基质蛋白的过度累积是糖尿病肾病的主要病理改变之一。研究发现,NF- κ B激活后,可以通过调节肾小球系膜细胞分泌的多种促纤维化因子,如VIAM-1、ICAM-1、IL-6和TGF- β 等,促进系膜细胞的增殖和肥大,最终加剧肾小球细胞外基质的积聚,从而促进糖尿病肾病的发生、发展^[64-68]。NF- κ B的激活可上调肾小管波形蛋白表达,促使间质纤维化加重^[66]。一些对抗炎症的药物在糖尿病肾病的研究中也显示出积极意义,被用来治疗糖尿病肾病。单核细胞趋化蛋白在糖尿病肾脏组织中明显增加,诱导巨噬细胞浸润导致肾损伤。单核细胞趋化蛋白的基因敲除鼠对糖尿病肾病具有一定抗性,使用单核细胞趋化蛋白的抑制剂也能在一定程度上对抗糖尿病肾病^[69]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)主要由单核细胞和巨噬细胞产生,在糖尿病肾脏中高表达,使用pentoxifylline,抑制TNF- α 的信使RNA水平,和血管紧张素受体阻断剂合用可以减少糖尿病肾病状态下的蛋白尿水平^[70]。许多研究都证实炎症信号转录因子NF- κ B在糖尿病肾病病理进程中发挥了重要作用,使用过氧化物酶体增殖激活受体- γ 、血管紧张素受体阻断剂或聚硫酸酯戊糖酸抑制NF- κ B的活性,都能在

一定程度上延缓糖尿病肾病的进程^[13]。mTOR 信号通路与炎症关系密切, mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 介导细胞的增殖, 对细胞的存活和细胞体积的变化有重要作用。雷帕霉素作为 mTOR 的抑制剂, 可以有效减少糖尿病肾脏系膜区的扩展及肾小球基底膜的增厚。雷帕霉素也能减少糖尿病肾病进程中肾脏组织中的炎症细胞如单核细胞和巨噬细胞的浸润, 减少促炎症因子和趋化因子的释放^[71]。

(4) 肾素血管紧张素系统的异常。在糖尿病肾病病程中, 血管紧张素 II 的活性增加, 其通过对血流动力学的影响, 增加肾小球毛细血管压力; 通过非血流动力学的影响, 促进肾脏细胞肥大和细胞外基质的累积。血管紧张素 II 诱导全身的血管收缩, 增加肾小球小动脉抗性和毛细血管压力, 上调肾小球毛细血管通透性, 减少滤过表面积, 刺激肾脏细胞外基质蛋白的增加和促进肾脏细胞增殖, 从而诱导糖尿病肾病的病理进程, 上述作用主要通过血管紧张素 II 与血管紧张素 1 型受体 (AT1) 的相互作用实现^[72-74]。血管紧张素 II 还能导致炎症和细胞凋亡, 促进 TGF- β 和 MCP-1 的生成^[75]。基于以上研究, 血管紧张素转化酶抑制剂和 AT1 拮抗剂成为糖尿病肾病治疗的有效药物, 不论是 1 型糖尿病还是 2 型糖尿病患者, 二者对其肾脏病变都有较好疗效, 能有效缓解糖尿病肾病患者或模型动物的血流动力学异常, 改善系膜和肾小管上皮细胞的肥大^[76,77]。Masako Furukawa 课题组的研究发现, AT1 抑制剂坎地沙坦 (candesartan), 能在不影响葡萄糖代谢的情况下降低血压和肾小球系膜细胞中细胞外基质的累积, 并且减少 ACR 和 IV 型胶原的分泌^[78]。TGF- β 是一种组织修复过程中重要的纤维化因子, 研究很早就发现, 高糖和血管紧张素 II 能够通过激活 TGF- β 进而促进胶原的合成^[79]。在此基础上, 上述研究小组发现, 糖尿病 KK 小鼠的肾小球中 TGF- β 的含量明显上调, 给予 AT1 抑制剂坎地沙坦 (candesartan) 后, 能明显降低肾小球中 TGF- β 的含量, 同时肾小球中 Smad7 的含量明显增加, 而 Smad7 被普遍认为是 TGF- β 信号通路的负性调控者。上述研究表明, TGF- β /Smad7 信号通路在糖尿病肾脏纤维化中具有重要作用, 通过抑制血管紧张素 1 型受体, 可以调控该信号通路, 改善糖尿病肾病。

(5) SphK1-S1P (sphingosine kinase 1-sphingosine 1-phosphate) 信号通路在糖尿病肾病中的作用。近年来, SphK1-S1P 信号通路与糖尿病肾病病变关系的研究开始受到关注。研究发现, 用高糖或 AGEs 处理 GMCs 后, SphK1 活性增强、S1P 增高, 诱使 GMCs 增殖; 观察链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病模型后肾脏中 SphK1 活性和 S1P 量的变化, 结果发现随着肾小球系膜细胞的增殖, 肾脏中 SphK1 活性和 S1P 含量均显著增加, 提示在糖尿病肾病 (损害) 状态下存在 SphK1/S1P 信号通路的激活, SphK1/S1P 信号通路可能参与了 GMCs 增殖、



细胞外基质积聚,以致肾脏纤维化的病理进程^[80-82]。在此基础上,我们课题组研究发现 S1P 可显著增加肾小球系膜细胞 AP-1 的 DNA 活性,采用 AP-1 的抑制剂姜黄素可显著抑制 S1P 诱导的 AP-1 活性。S1P 可上调 fibronectin mRNA 和蛋白表达,而 AP-1 抑制剂显著逆转了 S1P 诱导的 fibronectin 表达。同时观察到高糖刺激 GMCs 导致 AP-1 的 DNA 结合活性显著增加,高糖诱导 AP-1 活化可以完全被 SphK1 的抑制剂 DMS 所阻断,而高糖无法激活转染表达了突变型 SphK82D 系膜细胞中的 AP-1 活性。上述研究提示 SphK1-S1P 信号通路对核因子 AP-1 活性的调节起关键作用,活化 AP-1 的 DNA 结合活性是高糖激活 SphK1-S1P 信号通路、上调 GMCs 的 fibronectin 表达的重要机制^[83]。本课题组进一步研究还发现,糖尿病状态下, SphK1-S1P 信号通路与 AP-1 存在正反馈调节机制,该正反馈调节机制是高糖状态下 GMCs 中 SphK1-S1P 信号通路持续活化,并诱导 fibronectin 表达水平明显增加,进而促进糖尿病肾病发生发展的重要分子基础^[84]。综上所述, SphK1-S1P 信号通路的激活在糖尿病肾病病理进程中发挥了重要介导作用,开发 SphK1-S1P 信号通路的抑制剂对糖尿病肾病的治疗可能具有积极意义。

除上述因素之外,遗传易感因素、体内代谢紊乱、血流动力学改变、肾小球细胞外基质积聚、多种细胞因子表达增多、凝血机制异常等诸多因素也与糖尿病肾病的发病机制相关。目前,糖尿病肾病的防治措施包括严格的血糖和血压控制。在大型临床实验中显示,越早进行血糖控制,越能有效改善肾病进程。许多研究也显示血压控制对糖尿病肾病经常能起到缓解作用。对于发展到蛋白尿/肌酐率增加的患者,可通过药物抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统,从而降低蛋白尿/肌酐率。糖尿病肾病的防治措施还包括控制饮食、纠正脂代谢紊乱、逆转胰岛素抵抗、减少蛋白尿、保护肾功能和积极治疗并发症。然而,以上措施仍然不能达到满意的治疗效果,部分化学药物长期使用存在一定程度的毒副作用,如临床上长期使用的胰岛素增敏剂艾可拓被美国 FDA 认为具有诱导膀胱癌的风险。因而,进一步明确糖尿病肾病的病理生理机制,寻找潜在的药物靶点,开发有效低毒的药物,一直是糖尿病肾病研究领域的热点和难点。

对于糖尿病肾病患者,在合理使用药物治疗的情况下,健康的生活习惯和适当的运动能使药物的效应事半功倍。糖尿病肾病患者进行适当的运动锻炼可以改善代谢风险因子,如血压、血糖、血脂和氧化应激分子。糖尿病肾病患者进行适当的体育锻炼可以通过以下两个方面改善肾病症状:①体育锻炼可以通过改善代谢参数如血脂、血糖、血压和体重,减轻肾脏负担^[85]。运动可以通过影响一氧化氮的产生改善糖尿病肾病患者的健康状态^[86]。②限制热量摄取



和运动诱导的体重减轻,可以增加糖尿病肾病患者体内胰岛素的敏感性,有利于血糖调控^[87]。另有研究发现,在不改变代谢的情况下,锻炼也可以改善肾脏组织形态^[85]。对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠给予健康饮食和适量运动干预,对比高脂饮食和不运动组,能明显缓解糖尿病肾脏损伤,肾脏组织中 NF- κ B 的活性明显下调,单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的蛋白含量也显著下调^[88]。糖尿病肾病动物 KK-Ay 小鼠通过运动训练,在体重和血糖状态没有明显变化的情况下,尿 NAG 水平和尿中 ACR 含量都得到一定程度的改善^[89]。也有研究显示,运动可以减少糖尿病动物肾脏 MCP1 和巨噬细胞的浸润。糖尿病动物模型研究发现,低强度的运动比起中等强度的运动,更有益于恢复肾脏功能,当然还需要更多的研究来确定一个合适的运动强度^[85]。



第二章 介导糖尿病肾病的信号通路研究

为了进一步明确糖尿病肾病的发病机制,寻找更有效的糖尿病肾病药物治疗靶点,我们成立了以黄河清教授为领导,以谢曦博士为主要负责人的研究团队。在该领域已有研究的基础上,我们的团队以 RhoA/ROCK 信号通路和细胞缝隙连接蛋白 connexin 43 为研究对象,对糖尿病肾病的机制进行了深入探索,我们的研究成果展示如下。

第一节 RhoA/ROCK 信号通路在糖尿病肾病中的介导作用研究

一、研究背景介绍

Rho GTPases 是 Ras 超家族成员之一,属于小分子量 G 蛋白。Rho GTPases 家族包括 RhoA、RhoB、RhoC。丝氨酸/苏氨酸激酶 Rho-激酶是目前为止研究最多的 RhoA 下游靶蛋白。绝大多数 Rho GTPases 都像一个“分子开关”,在激活状态(与 GTP 结合)和失活状态(与 GDP 结合)之间循环。Rho GTPases 的状态受三种蛋白的调控:鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEFs)催化 GTP 与 Rho 蛋白结合,Rho 呈现激活状态。激活的 Rho 再被异戊烯化,随后 Rho 转位到细胞膜,激活下游相关蛋白,诱导生理效应产生。GTPase-激活蛋白(GAPs)通过诱导 Rho 蛋白的催化活性,水解 GTP 为 GDP。鸟嘌呤分离抑制因子(RhoGDIs)通过隐藏 Rho GTPases 的异戊二烯醇基团,将 Rho GTPases 滞留在细胞浆中。RhoGDIs 还通过阻止 GDP 与 Rho GTPases 的分离,使 Rho GTPases 处于无活性状态。RhoGDIs 与 Rho GTPases 的分离是 GEFs 激活 Rho GTPases 的关键。除了以上三种蛋白外,Rho GTPases 的活性也受磷酸化调控。蛋白激酶 A 和 G,通过丝氨酸磷酸化 Rho GTPases,阻止 Rho GTPases 的泛素化和蛋白酶体降解。Rho GTPases 与 GTP 结合后,与许多效应分子相互作用,诱导信号级联反应,促进一系列的细胞响应^[93,94]。在 Rho GTPases 的下游效应分子中,Rho-相关激酶(ROCKs)是目前研究最多的一种蛋白。在哺乳动物中,ROCKs 包括两种亚型:ROCK1(也被称为 ROK β)和 ROCK2(也被称为 ROK α)。RhoA 结合



GTP 活化后与下游激酶 ROCK 的卷曲螺旋结构结合,使其发生多个氨基酸位点的磷酸化而被激活,并介导下游一系列磷酸化/脱磷酸化反应^[95],调控包括细胞收缩、迁移、黏附、细胞周期和基因表达等^[96]。既往研究发现,RhoA/ROCK 信号通路的激活,在动脉高压^[97]、心脏病^[98]、脑卒中^[99]、AD^[100]等心脑血管疾病的发病过程中都发挥了一定的介导作用。

相关研究表明,链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾脏皮质中,RhoA 转位到细胞膜上^[101]。在体外高糖培养的肾小球系膜细胞中也观察到了 RhoA 的激活^[102]。运用 ROCK 抑制剂 Y27632 和法苏地尔,发现其能改善糖尿病模型动物肾脏通透性^[103]和肾脏血流动力^[104,105],改善肾脏代谢参数^[106],减少肾脏氧化应激^[107]和细胞外基质累积^[108,109],从而减缓糖尿病肾病的病变进程。上述研究结果提示我们,RhoA/ROCK 信号通路的激活与糖尿病肾病的发生、发展关系密切。鉴于糖尿病状态下,肾脏核转录因子 NF- κ B 炎症信号通路的激活,是引起 fibronectin 等细胞外基质形成、促进糖尿病肾病病变进程的重要机制,那么,在糖尿病状态下,活化的 RhoA/ROCK 信号通路是否在一定程度上参与调控了肾脏 NF- κ B 的活性、导致肾脏出现炎症反应,进而促进了 fibronectin 等细胞外基质的积聚,最终促使糖尿病肾病形成,有待研究证实。

据此,我们拟从体内动物实验和体外细胞实验两部分探讨糖尿病肾病中 RhoA/ROCK 信号通路是否参与了 NF- κ B 活性的调控,从而通过介导肾脏的炎症反应促进了糖尿病肾病的形成。我们使用高糖培养原代大鼠肾小球系膜细胞,观察 ROCK 抑制剂 Y27632 对肾小球系膜细胞 NF- κ B 及 fibronectin 等相关炎症指标的影响。RhoA 突变质粒(持续活化质粒 RhoAQ63L 和活性抑制质粒 RhoN19)也被我们用于细胞水平的探索,以进一步确定 RhoA/ROCK 信号通路对 NF- κ B 活性的调控。体内实验通过链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病的 Sprague Dawley (SD) 大鼠,给予 ROCK 抑制剂法苏地尔观察其对糖尿病肾病的改善作用,以及对肾脏组织中 NF- κ B 及其相关炎症分子的影响。

二、研究结果

体内和体外研究结果提示,在实验性糖尿病肾病中 RhoA/ROCK 信号通路参与了 NF- κ B 的活化,通过影响 NF- κ B 的活性进而调控下游炎症相关蛋白 ICAM-1、TGF- β 和细胞外基质蛋白 fibronectin 的合成表达,促进糖尿病肾病的发展,抑制 RhoA/ROCK 信号通路能有效抑制 NF- κ B 炎症信号通路的激活,进而缓解糖尿病肾病的病变进程。

1. 肾小球系膜细胞中,高糖同时激活 RhoA/ROCK 信号通路和 NF- κ B 信号通路

非病理情况下,NF- κ B 与抑制性蛋白 I κ B 结合存在于胞浆中,在炎症或某些物理刺激存在的情况下,IKK 活化,丝氨酸磷酸化 I κ B,I κ B 降解,NF- κ B p65 转位进入细胞核;ROCK 激活后,主要的底物是肌球蛋白轻链磷酸酶