

Notch 信号转导通路与糖尿病肾病的关系

袁琴 王秋月

【摘要】 糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见微血管病变之一,高糖状态、高血压、免疫炎症反应等因素均可导致肾功能减退,加速 DN 的发生和发展。Notch 信号转导通路作为在进化上高度保守的信号系统,可通过调节细胞间的相互作用,影响细胞、组织及器官的分化和发育。研究表明,在 DN 中 Notch 信号转导通路明显活化,并通过影响血管生成和胰腺内分泌及外分泌细胞发生、介导肾小球功能损伤和足细胞凋亡、促进肾小管间质损伤和纤维化进展,影响 DN 的进展。阻断 Notch 通路可能成为 DN 治疗的新靶点。

【关键词】 糖尿病肾病; Notch 通路; 信号转导

Relationship between Notch signaling and diabetic nephropathy Yuan Qin, Wang Qiuyue. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Wang Qiuyue, Email: wqycmu@163.com

【Abstract】 Diabetic nephropathy (DN) is one of the most common microvascular complications of diabetes. Hyperglycemia, hypertension and immune-inflammation can cause the decline of renal function, which can in turn promote the development of DN. Notch signaling is an evolutionarily conserved signal pathway which regulates the cell-to-cell communication, thus to influence the differentiation and development of cell, tissue and organ. Researches have shown that Notch signaling is activated in DN and then promote the development of DN by affecting angiogenesis and genesis of pancreatic endocrine and exocrine cells, mediating functional injury of glomerular cells and podocyte apoptosis, and promoting tubular interstitial injury and fibrosis development. Blocking Notch signaling may be a new target for treatment of DN.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Notch signaling; Signal transduction

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 127-130)

据统计,糖尿病肾病(DN)在糖尿病不同时期的发病率约为 20%~30%,是目前世界上终末期肾病的重要死亡原因之一^[1]。Notch 基因由 Morgan 等在果蝇体内首先发现,因其部分功能缺失可造成果蝇翅膀的边缘切迹(Notch)而得名。Notch 蛋白广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物,是一种在进化上高度保守的跨膜受体蛋白家族,可介导细胞间的相互作用,是影响细胞命运的重要通路之一。Notch 信号转导通路活化后可诱导肾小球及肾小管病变的产生,其与 DN 的关系已被多项研究证实^[2]。抑制 Notch 通路可显著改善肾脏损伤,可作为 DN 治疗的新靶点。

1 Notch 信号转导通路概述

1.1 Notch 通路受体与配体 哺乳动物体内有 4 种同源 Notch 受体(Notch1~4),均为 I 型跨膜蛋白,与果蝇体内的 Notch1~4 相对应,由胞内结构域、跨膜部分和胞外结构域组成。胞内结构域包含一个 N 端 RAM 结构域、6 个锚蛋白样重复序列、2 个核定位信号、1 个转录激活区及 1 个 PEST 结构域;跨膜部分主要由钙离子依赖的非共价键结合形成的异源性二聚体构成;胞外结构域由数个表皮生长因子样重复序列和富含半胱氨酸的 LNR 样重复序列组成^[3]。Notch 同源配体有 5 种,包括 Delta 样分子(Dll1、3、4)和 Jagged 样分子(Jagged1、2),分别与果蝇体内的 Dll1、3、4 及 Serrate 样分子(Serrate1、2)相对应,同样均为 I 型跨膜蛋白,由数量不等的表皮生长因子样重复序列组成。Notch 受体与配体的活化和表达均具有细胞种类和组织特异性^[3]。

1.2 Notch 信号转导通路激活途径 经典的 Notch

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.02.016

基金项目:辽宁省科技攻关计划项目(2011225017);沈阳市科技攻关项目(F11-262-9-06);辽宁省“百千万人才工程”资助项目(2011 年)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院内分泌科

通信作者:王秋月,Email:wqycmu@163.com

通路又称为 CBF-1/RBP-J κ 依赖途径,由两个邻近细胞的 Notch 受体与配体相互作用而激活^[4]。Notch 信号通路在活化过程中经过 3 次裂解过程,分别为:(1)Notch 受体分子成熟过程中受 Furin 样转化酶裂解产生胞内结构域、跨膜部分和胞外结构域 3 部分。(2)Notch 受体与相应配体结合激发由金属蛋白酶介导的蛋白溶解反应,胞外结构域被吞噬,受体构象发生变化。(3)第 3 个裂解位点位于跨膜部分, γ 分泌素复合物、早老素等可作用于该位点,进一步促使胞内结构域释放并移位入核,与 DNA 结合蛋白 RBP-J κ (也称为 CSL/CBF1)结合,并招募共活化因子等形成转录活化因子,活化靶基因的转录,主要是 Hes 和 Hey 等碱性螺旋-环-螺旋基因家族成员,进而调控下游蛋白的表达^[5]。

2 Notch 信号通路与肾脏发育及肾脏疾病的关系

多项研究表明,Notch 通路可介导细胞间的相互影响,在肾脏发育过程发挥不可忽视的作用^[6]。Notch1、Notch2 主要在肾小囊、逗号型和 S 型小体中及未成熟的肾单位中表达^[7]。Notch3 主要在肾血管的平滑肌细胞中表达^[8]。Notch4 和 Dll4 仅表达于血管内皮细胞中^[9]。Jagged1、2 及 Dll1 主要在肾小管表达,而 Dll3 在发育中的肾单位中没有明显表达。

Notch 通路活化与多种肾脏疾病相关。Sharma 等^[10]在艾滋病患者的肾组织及艾滋病鼠模型中均观察到明显的局灶性肾小球硬化,并检测到肾小球 Notch1、Notch4 及 Hes-1 表达上调。进一步研究发现,经 γ 分泌素抑制剂(Gamma-secretase inhibitor, GSI)处理后,肾组织损伤及肾功能明显恢复,足细胞增殖、去分化及细胞坏死标志物水平降低,表明 Notch 通路可促进 HIV 相关肾病的发生与进展,阻断 Notch 通路可能成为 HIV 相关肾病治疗的新策略^[11]。Huang 等^[12]将雄性大鼠分成盐处理对照组、盐处理肾缺血-再灌注组及 GSI 处理肾缺血-再灌注组,结果发现,肾缺血-再灌注时 Notch2/Hes-1、尿素氮、肿瘤坏死因子- α 、核因子- κ B、单核细胞趋化因子-1 等表达均明显上调,诱导严重的肾小管损伤,经 GSI 处理后上述指标不同程度下降,肾小管细胞凋亡指数下降,表明 Notch 通路参与肾缺血-再灌注损伤相关的炎症反应及凋亡过程,这与 Gupta 等^[13]的研究结果一致。Notch 通路活化还可发生于肾细胞癌中,抑制 Notch 通路后,癌细胞生长速度明显减慢,但在小鼠肾细胞中表达 Notch1 胞内结构域并不能诱导肾细胞癌的发生,表明 Notch 通路可能仅在进展期肾细胞癌中发挥一定作用而非始动因子^[14]。

3 Notch 信号通路与 DN

3.1 胰岛内分泌及外分泌细胞的发生 血糖控制欠佳,胰岛素敏感性下降是 DN 的发病机制之一,Notch 信号通路可以影响胰岛细胞的发生及胰岛 β 细胞功能^[15]。胰岛前体细胞中转录因子 neurogenin-3 的短暂表达是前者分化为胰岛细胞的重要标志,正常发育的胰腺中 Notch 信号激活可阻止前体细胞分化,而分化完全的胰腺内分泌腺体对 Notch 则无反应。Shimajiri 等^[16]利用表达碱性磷酸酶和强化绿色荧光蛋白的转基因小鼠来观察 Notch 通路对胰岛细胞发生的影响,发现经 GSI 处理后,Notch 通路被阻断,培养 11.5 d 的胚胎胰腺组织中碱性磷酸酶和强化绿色荧光蛋白表达均增加,胰腺发育恢复正常。目前关于胰腺早期发育与 DN(尤其是 1 型糖尿病)的关系仍未有确切的临床观察及实验室结果证实,且具体机制仍不明确,但不可否认的是,Notch 通路在胰腺早期发育中起重要调节作用,进一步研究其与 DN 的关系对于开发潜在治疗靶点,为胰腺发育不良或胰腺内分泌功能完全缺失的 DN 患者提供有效的治疗方法具有重要意义。

3.2 肾小球功能损伤及足细胞凋亡 在不同肾小球疾病中 Notch 受体(如 Notch1、2)及配体(Jagged1)表达增加,与反映肾小球病变程度的指标如白蛋白尿水平及肾小球硬化等存在明显相关性^[7]。足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分,可有效阻止血清蛋白通过。最近研究表明,足细胞损伤、数量减少和去分化等在 DN 的发病机制中占有重要地位。临床观察发现,2 型糖尿病患者中足细胞密度、白蛋白尿和肾功能减退三者之间存在明确的相关性^[17]。Kato 和 Susztak^[18]研究发现,Notch/Wnt 通路活化可引起足细胞去分化、分离和永久凋亡,进一步导致肾小球硬化,限制该通路活化可能阻止这一恶性循环。Wang 等^[2]以特异性抑制剂或短发夹 RNA 抑制高糖处理的小鼠足细胞中 Notch 通路活化,发现足细胞凋亡率明显降低。Lin 等^[19]在高糖培养的人足细胞中观察到,Notch1 及血管内皮生长因子表达水平升高,足细胞数目和 nephrin 表达明显减少;通过 GSI 处理或应用特异性短发夹 RNA,抑制 Notch1 的表达后,血管内皮生长因子表达明显减少,而足细胞数目有所恢复;以 GSI 处理 DN 小鼠模型,除上述发现,还发现白蛋白尿明显改善,证实调节 Notch1 的表达可显著改善足细胞功能,延缓 DN 白蛋白尿的产生和肾功能减退。Gao 等^[20]发现在高糖培养的小鼠肾小球足细胞中 Notch 通路活化,并可通过 Bcl-2、p53 途径诱导足细胞凋亡,应用

特异性短发夹 RNA 抑制 Notch 通路后, Bcl-2、p53 依赖性的足细胞凋亡随之被阻断。

3.3 肾小管间质损伤及纤维化 肾间质纤维化主要表现为胶原和细胞外基质积聚、纤维母细胞增殖、上皮细胞功能异常及血管缺失。转化生长因子 β 可以促进肾小球系膜基质增殖、积聚, 是肾纤维化的重要启动因子^[21]。Notch 通路可介导培养的人或小鼠肾小管上皮细胞中转化生长因子 β 诱导的上皮间充质转化, 增加肾小管周围炎症反应细胞浸润和间质纤维母细胞增殖, 后者共同导致基质蛋白积聚, 加快肾间质纤维化的发生^[22]。Liu 等^[23]发现在高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞中, Notch1、Jagged1、转化生长因子 β 表达均明显上调, 纤维连接蛋白产生增加, 提示发生肾间质纤维化; GSI 处理组则可观察到 Notch1、Jagged1、转化生长因子 β 及纤维连接蛋白均显著降低。转化生长因子 β 与 Notch 通路之间存在正反馈调节机制, 共同促进肾间质纤维化的发生和发展。

3.4 血管生成 Notch 通路对胚胎正常的血管系统发生极为重要, 敲除 Dll4 的小鼠血管生成明显受抑制。血管内皮生长因子作为血管生成的重要调节因子, 其与 Dll4/Notch 信号通路形成一个反馈作用环路: 血管内皮生长因子可激活血管内皮细胞 Dll4/Notch1 的表达, 新生血管生成和血管网形成; 而后者过表达时又可通过上调的 Hey1 抑制血管内皮生长因子受体 2 的表达, 负向调节血管新生, 抑制血管内皮细胞增殖和迁移, 影响内皮细胞功能^[24]。众所周知, DN 是糖尿病重要的微血管病变之一, 表现为小动脉透明样变性, 微血管结构的破坏和缺失与局部促血管生成因子和抗血管生成因子(如 Notch)表达失衡有关。血管内皮生长因子表达上调可通过促进血管内皮细胞增殖、增加血管通透性等促进血管新生, 是机体一种适应性代偿机制, 通过促进微血管新生改善组织血供, 防止 DN 的进行性发展, 此时 Notch 信号通路的不适当高表达可部分抵消这种代偿机制, 影响 DN 预后。目前尚未有明确的文献证实 Notch 通路与糖尿病或慢性肾病肾动脉功能或新生血管生成之间的关系, 但以 GSI 阻断 Notch 通路后, 可通过加强缺血区功能性血管床生成, 改善局部血液灌注, 相关机制仍有待进一步研究^[25]。

4 小结

Notch 通路可通过多种途径参与 DN 的发展, 影响 DN 预后。阻断 Notch 通路可显著改善足细胞功能、肾间质纤维化、恢复肾脏血流灌注, 保护肾脏功

能, 延缓 DN 进展。目前 Notch 通路与 DN 关系的研究已受到广泛关注, 且逐渐过渡到分子及基因水平。Kavanagh 等^[26]研究发现, 虽然 Notch 通路中 4 种基因(Jagged1、Hes1、Notch3 和基质金属蛋白酶 10)单核苷酸多态性在 1 型糖尿病患者活检组织中的表达均有不同程度增加, 但单位点的突变与 DN 并无相关性。对 Notch2 基因多态性与 2 型糖尿病相关性的研究亦得出类似结论^[27]。不可否认的是在 DN 进程中, Notch 通路各组分的表达均明显增加, 因此两者之间的联系、Notch 通路影响 DN 的机制及抑制 Notch 通路对 DN 治疗的效果仍需进一步的研究证实。

参 考 文 献

- [1] Groop PH, Thomas MC, Moran JL, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2009, 58(7): 1651-1658.
- [2] Wang XM, Yao M, Liu SX, et al. Interplay between the Notch and PI3K/Akt pathways in high glucose-induced podocyte apoptosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(2): F205-F213.
- [3] Greenwald I, Kovall R. Notch signaling: genetics and structure [J]. WormBook, 2013, 17: 1-28.
- [4] Kopan R, Hagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. Cell, 2009, 137(2): 216-233.
- [5] Arnett KL, Hass M, McArthur DG, et al. Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes [J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17(11): 1312-1317.
- [6] Liu Z, Chen S, Boyle S, et al. The extracellular domain of Notch2 increases its cell-surface abundance and ligand responsiveness during kidney development [J]. Dev Cell, 2013, 25(6): 585-598.
- [7] Murea M, Park JK, Sharma S, et al. Expressions of Notch pathway proteins correlate with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function [J]. Kidney Int, 2010, 78(5): 514-522.
- [8] Boulous N, Helle F, Dussaule JC, et al. Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone [J]. Hypertension, 2011, 57(6): 1176-1182.
- [9] Yan M, Callahan CA, Beyer JC, et al. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms [J]. Nature, 2010, 463(7282): E6-E7.
- [10] Sharma M, Callen S, Zhang D, et al. Activation of Notch signaling pathway in HIV-associated nephropathy [J]. AIDS, 2010, 24(14): 2161-2170.
- [11] Sharma M, Magenheimer LK, Home T, et al. Inhibition of Notch pathway attenuates the progression of human immunodeficiency virus-associated nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(8): F1127-F1136.
- [12] Huang R, Zhou Q, Veeragoo P, et al. Notch2/Hes-1 pathway plays an important role in renal ischemia and reperfusion injury-associated inflammation and apoptosis and the γ -secretase inhibitor DAPT has a nephroprotective effect [J]. Ren Fail,

- 2011, 33(2):207-216.
- [13] Gupta S, Li S, Abedin MJ, et al. Effect of Notch activation on the regenerative response to acute renal failure[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1):F209-F215.
- [14] Sirin Y, Susztak K. Notch in the kidney: development and disease [J]. J Pathol, 2012, 226(2):394-403.
- [15] Bjornstad P, Snell-Bergeon JK, Rewers M, et al. Early diabetic nephropathy: a complication of reduced insulin sensitivity in type 1 diabetes [J]. Diabetes Care, 2013, 36(11):3678-3683.
- [16] Shimajiri Y, Kosaka Y, Scheel DW, et al. A mouse model for monitoring islet cell genesis and developing therapies for diabetes [J]. Dis Model Mech, 2011, 4(2):268-276.
- [17] Niranjana T, Murea M, Susztak K. The pathogenic role of Notch activation in podocytes[J]. Nephron Exp Nephrol, 2009, 111(4):e73-e79.
- [18] Kato H, Susztak K. Repair problems in podocytes: Wnt, Notch, and glomerulosclerosis[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(4):350-356.
- [19] Lin CL, Wang FS, Hsu YC, et al. Modulation of notch-1 signaling alleviates vascular endothelial growth factor-mediated diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2010, 59(8):1915-1925.
- [20] Gao F, Yao M, Shi Y, et al. Notch pathway is involved in high glucose-induced apoptosis in podocytes via Bcl-2 and p53 pathways [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5):1029-1038.
- [21] Hills CE, Squires PE. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy [J]. Am J Nephrol, 2010, 31(1):68-74.
- [22] Djurdjaj S, Chatziantoniou C, Raffetseder U, et al. Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury [J]. J Pathol, 2012, 228(3):286-299.
- [23] Liu L, Gao C, Chen G, et al. Notch signaling molecules activate TGF-beta in rat mesangial cells under high glucose conditions [J]. J Diabetes Res, 2013, 2013:979702.
- [24] Thomas JL, Baker K, Han J, et al. Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(10):1779-1792.
- [25] Cao L, Arany PR, Kim J, et al. Modulating Notch signaling to enhance neovascularization and reperfusion in diabetic mice [J]. Biomaterials, 2010, 31(34):9048-9056.
- [26] Kavanagh D, McKay GJ, Patterson CC, et al. Association analysis of Notch pathway signalling genes in diabetic nephropathy [J]. Diabetologia, 2011, 54(2):334-338.
- [27] McCarthy MI, Zeggini E. Genome-wide association studies in type 2 diabetes [J]. Curr Diab Rep, 2009, 9(2):164-171.

(收稿日期:2013-10-15)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《国际内分泌代谢杂志》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部