

早期生长反应因子-1 与糖尿病肾病

王丹 关美萍 薛耀明

【摘要】 早期生长反应因子-1 (Egr-1) 是一种具有锌指结构的转录因子, 能被多种刺激因素诱导, 并能调控下游多种基因的表达, 参与细胞的生长、分化、增殖和凋亡。研究发现, 高血糖可引起肾脏 Egr-1 表达增加, 促进系膜细胞增殖、血管内皮功能损伤、细胞外基质积聚、转化生长因子- β 过表达和肾纤维化, 表明 Egr-1 与糖尿病肾病的发生、发展密切相关。

【关键词】 早期生长反应因子-1; 糖尿病肾病; 肾纤维化

Early growth response factor-1 and diabetic nephropathy Wang Dan, Guan Meiping, Xue Yaoming.
Department of Endocrinology and Metabolism, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Xue Yaoming, Email: xueyaoming999@126.com

【Abstract】 Early growth response factor-1 (Egr-1) is a zinc finger transcription factor, which can be induced by a variety of stimulus and can also regulate the expression of multiple downstream genes. Egr-1 involves in cell growth, differentiation, proliferation and apoptosis. Studies have found that hyperglycemia can lead to an increase of Egr-1 expression which contributes to mesangial cells proliferation, endothelial dysfunction, extracellular matrix accumulating, overexpression of transformation growth factor- β and renal fibrosis. Therefore Egr-1 is closely related to the development and progression of diabetic nephropathy.

【Key words】 Early growth response factor-1; Diabetic nephropathy; Renal fibrosis

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34:397-400)

糖尿病肾病(DN)是糖尿病患者主要微血管并发症之一,在糖尿病患者中的发病率为20%~40%。DN是导致终末期肾病发生的最重要原因之一,同时也是糖尿病患者生活质量下降和病死率增加的主要原因之一。DN发病可能与遗传易感性,糖、脂代谢紊乱,肾小球血流动力学改变及细胞因子表达异常等因素有关^[1]。DN经积极干预其发展是可以被阻止或延缓于任何一个阶段,早期甚至是可以逆转的。DN的病因甚为复杂,是遗传和环境因素共同作用的结果,使肾小球血流量、肾小球滤过率及压力增加,肾组织缺血、缺氧。其中,醛糖还原酶和蛋白激酶C(PKC)的激活、蛋白非酶糖基化、多元醇途径活化及氧化应激等为葡萄糖代谢障碍的直接后果,细胞因子特别是转化生长因子的过表达、细胞周期及凋亡障碍都是发病的关键。肾素-血管紧张素系

统异常亦是重要参与因素^[1]。这些因素的长期存在导致肾小球系膜基质及基底膜合成增加、降解减少,最终导致肾小球硬化。近年来有研究提示早期生长反应因子(Egr)-1作为一种核转录因子与DN的发生、发展相关。

1 Egr-1 概述

1.1 分类和结构 Egr-1 又称为 NFYI-A、Krox24、TIS8 或 zif268 等,是一种具有锌指结构的转录因子,为即刻早期基因(immediate early gene)家族成员。Egr 基因家族成员有 30 多种,包括 Egr-1, Egr-2, Egr-3, Egr-4, c-fos, c-myc 和 c-Jun 等。Sukhatme 等^[2]应用原位杂交技术发现:人类 Egr-1 基因包含 2 个外显子、1 个内含子,位于第 5 对染色体 q23-q31 区域,长 211 kb,编码 313 kb 成熟的 mRNA。Egr-1 基因组下游为外显子区域,由 533 个氨基酸组成 Egr-1 蛋白产物,其相对分子质量约为 82 000。Egr-1 的分子结构中包括 DNA 结合、转录激活及抑制 3 个功能区。在 DNA 结合功能区中含有 3 个 Cys₂-His₂ 亚型的锌指结构,可以与富含 GC 的 DNA 序列特异结合而发挥作用^[3]。在 DNA 结合区与转录激活区之间的抑制区则可以通过与阻遏蛋白 NAB1、2

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.06.0010

基金项目:广东省级产业技术研究与开发专项(粤财工[2010]207)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院内分泌代谢科
通信作者:薛耀明,Email:xueyaoming999@126.com

结合而阻断 Egr-1 对靶基因的转录激活功能 (图 1)^[4-5]。

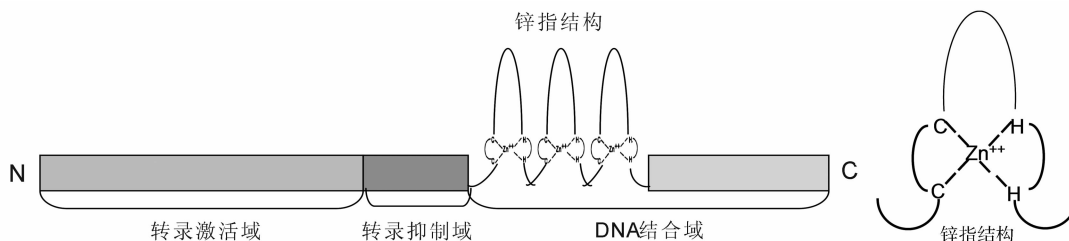
1.2 表达和功能 Egr-1 普遍存在于从酵母到人的真核细胞基因库中,在淋巴细胞、单核细胞、骨髓细胞、肝细胞、神经细胞等均有表达。在肾脏,肾小球系膜细胞、内皮细胞、肾小管成纤维细胞及上皮细胞均检测到有 Egr-1 表达^[6]。多种刺激物如电离射线、紫外线照射、张力刺激、低氧、缺血或再灌注损伤、化疗药物、多肽生长因子、切应力和尿素等可诱导 Egr-1 基因的快速表达^[7]。蛋白激酶是激活 Egr-1 最关键的上游信号分子,丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路是研究最为广泛的信号通路之一^[8]。PKC 也是调控 Egr-1 的重要信号分子^[9]。Egr-1 诱导后调控一系列基因的表达,包括细胞间黏附分子-1、血小板衍生生长因子 A/B 链、转化生长因子(TGF)- β 、巨噬细胞集落刺激因子、组织因子等,参与细胞的生长、分化、增殖、凋亡以及肿瘤的发生^[10]。另外,Egr-1 还被认为与器官纤维化有关。有研究发现在纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 基因敲除的小鼠能自发出现心肌纤维化,而不累及其他脏器。Ghosh 等^[11]应用基因组学的方法对这一现象进行研究发现,PAI-1 基因敲除的小鼠肾脏,锚蛋白重复结构域 1 (Ankyrin repeat domain 1)-Egr-1-胶原/细胞外基质 (ECM) 轴被抑制,而在心脏此轴却是被激活的。因此,仅仅是心脏发生了特异性的纤维化。

2 Egr-1 参与 DN 发生的机制

2.1 促进系膜细胞增殖 肾小球系膜细胞增殖是 DN 和多种类型肾小球肾炎的组织病理学改变。Xu 等^[12]在模拟 DN 的体外实验中用 30 mmol/L 高糖培养大鼠肾小球系膜细胞,MTT 法分别于 12, 24, 48 h 检测细胞增殖情况。结果发现,与对照组 (5.6 mmol/L) 相比,高糖组细胞在上述几个时间点均增殖明显。刘洁等^[13]采用脂质体法瞬时转染 Egr-1

质粒进入高糖环境中培养的小鼠肾小球系膜细胞,应用 MTT 法检测该细胞的增殖程度,证实 Egr-1 可以促进小鼠系膜细胞增殖。而 Egr-1 引起系膜细胞增殖也在不少肾病研究中得到证实。Hofer 等^[14]对原代培养的大鼠系膜细胞进行研究,应用反义寡核苷酸抑制血清诱导的 Egr-1 基因表达,^[3+H]-Thymidine 掺入法检测系膜细胞增殖和活细胞数量。结果发现,反义寡核苷酸抑制 Egr-1 mRNA 和蛋白表达的同时,系膜细胞生长和增殖亦受到明显抑制。同样在动物实验中,Carl 等^[15]制备了肾小球肾炎的大鼠模型,发现造模后 6 d,肾炎导致 Sprague-Dawley 大鼠 Egr-1 蛋白表达较对照组升高了 6 倍,同时伴有肾小球细胞数量增多,肾小球丛区面积增大及有丝分裂像的数量增加,但应用特异性反义寡核苷酸后上述指标均明显下降。Solow 等^[16]研究小鼠系膜细胞发现,胰岛素通过胰岛素受体底物-1 酪氨酸磷酸化和 MAPK 通路刺激 Egr-1 的表达,引起系膜细胞增生,导致肾小球肾炎和 DN。血管紧张素 II 通过抑制胰岛素受体底物-1 酪氨酸磷酸化,从而抑制胰岛素诱导的 Egr-1 的表达。

2.2 引起血管内皮功能损伤 DN 是糖尿病主要的微血管并发症之一,病变主要累及肾脏小血管和肾小球,引起蛋白排泄和滤过异常。长期的葡萄糖代谢障碍、肾血流动力学改变导致肾组织缺血、缺氧。有研究证实,Egr-1 作为一个关键的转录因子参与了血管病理生理改变,包括糖尿病血管并发症。Hasan 等^[17]对小鼠肾小球血管内皮细胞研究发现,胰岛素和葡萄糖均能刺激 Egr-1 mRNA 和蛋白表达及其启动子活性。同时,作为 Egr-1 的反应基因,血管内皮生长因子受体-1 和 PAI-1 也被上调。但胰岛素或葡萄糖诱导 Egr-1 表达的分子机制不同,前者是通过细胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 信号通路激活,后者则是 PKC 通路。Yan 等^[9]利用 PKC β 基因敲除的小鼠研究证实,缺氧、缺血-再灌注、急性血管



注: Egr-1: 早期生长反应因子-1

图 1 Egr-1 蛋白结构示意图

损伤、高脂血症等均可激活 PKC,特别是 PKC β II,后者是重要的 Egr-1 诱导剂。被上调的 Egr-1 可调控其下游多种基因表达,如趋化因子、促凝分子、黏附分子等。参与对缺氧、缺血-再灌注和血管应激的反应,引起炎症反应、细胞增殖、迁移等,造成血管内皮功能紊乱,组织损伤。曹艳丽等^[18]利用人脐静脉内皮细胞体外培养,予以高糖和(或)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与内皮细胞共同孵育发现,Egr-1 和 PAI-1 蛋白表达明显增加,在肥胖、糖尿病等代谢紊乱所致的血管并发症的发生中起重要作用。而最近 Vedantham 等^[19]对转基因糖尿病小鼠及小鼠主动脉内皮细胞的研究发现,高糖通过醛糖还原酶可诱导乙酰化的 Egr-1 基因持续表达,并随之引起其下游靶基因组织因子和血管细胞黏附分子-1 表达增加,从而导致血管的促炎和促凝信号通路激活。

2.3 促进 TGF- β 过表达和肾纤维化 TGF- β 与肾纤维化密切相关。目前已经明确 TGF- β 启动子中含有两个富含 GC 的 Egr-1 的结合位点,活化的 Egr-1 可以通过与这些位点的直接结合而调控其表达^[20]。此外,表达的 TGF- β 本身又可作为刺激源激活 Egr-1,从而形成一个作用级联放大的正反馈环。Chen 等^[21]通过培养人皮肤成纤维细胞发现,TGF- β 可通过经典的 Smad 通路,刺激 Egr-1 基因启动子活性,诱导 Egr-1 mRNA 和蛋白快速而短暂的升高。此外,TGF- β 还能增强 Egr-1 与人 Col1A2 (1 型胶原 α 2 基因,该基因表达 1 型胶原 α 2 链)启动子的结合,导致 Col1A2 启动子活性增加。由此推测 TGF- β 可引发 Egr-1 的促纤维化反应,Egr-1 可能是器官纤维化发病机制中的重要环节。Nakamura 等^[22]则证实 Egr-1 能上调 TGF- β 的水平。他们制造了单侧输尿管结扎术后肾间质纤维化的大鼠模型,检测发现,肾皮质 Egr-1 表达增加,并伴随 TGF- β 、 α -平滑肌肌动蛋白及 I 型胶原的表达增加;应用电穿孔介导的基因转移方式将 Egr-1 抑制剂特异脱氧核酶 ED5 注入肾间质成纤维细胞中,出现 TGF- β 、 α -SMA 及 I 型胶原 mRNA 表达明显减少,说明 ED5 抑制了肾间质纤维化。Friedrich 等^[23]将含有 Egr-1 的质粒瞬时转染到人肾成纤维细胞(TK188),使 Egr-1 蛋白表达增加,定量逆转录-PCR 检测发现组织型金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)和骨桥蛋白 mRNA 表达随之增加。分别使用盐皮质激素醋酸脱氧皮质酮(DOCA)和 TGF- β 刺激 TK188 细胞,发现二者均能诱导 Egr-1 的表达。同时证实 DOCA 通过诱导 Egr-1 的表达增加其下游 TIMP-1 和

骨桥蛋白的基因表达;然而 TGF- β 诱导的 Col1A1 和结缔组织生长因子表达增加则是独立于 Egr-1 之外的。说明 Egr-1 可能参与了 DOCA 诱导的肾组织纤维化。DN 的病理改变包括肾小球硬化和肾间质纤维化。Gil 等^[24]采用链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病模型,在造模成功后 10 周,定量逆转录-PCR 检测小鼠肾组织发现 Egr-1 mRNA 表达明显增加,而在 16 周后对肾组织进行 PAS 和 Masson 染色、免疫组织化学检测:发现与非糖尿病对照组小鼠相比,糖尿病小鼠肾小球系膜扩张,肾小管间质纤维化,肾组织 TGF- β ₁ 高表达。由此说明 Egr-1 和 TGF- β 参与了 DN 的发生、发展。在体外实验中,Han 等^[25]用高糖刺激小鼠肾皮质成纤维细胞,发现细胞增殖、TGF- β 表达显著升高,c-myc、Egr-1 mRNA 短暂增加,于 48 h 后回到基线水平。抗 TGF- β 处理后,活细胞数量、TGF- β ₁、I 型胶原 mRNA 和蛋白均明显减少。刘洁等^[13]证实,在高糖环境中肾小球系膜细胞 Egr-1、TGF- β 及血小板衍生生长因子-B 表达增强,细胞上清液中 IV 型胶原浓度升高,Egr-1 基因转染后上述变化较高糖组更加显著。推测 Egr-1 可上调 TGF- β 及血小板衍生生长因子-B 表达,是加速肾小球硬化的可能机制之一。

2.4 引起 ECM 积聚 ECM 增加和种类变化是 DN 肾小球病变的重要特征。肾小球基底膜是特殊的 ECM,由胶原和非胶原蛋白组成。胶原成分主要为 IV 型胶原,非胶原为结构性蛋白质和蛋白糖苷,其代表有唾液酸、硫酸肝素、氨基葡萄糖苷、纤维连接蛋白等。李晨钟等^[26]对 2 型糖尿病患者的血清 ECM 蛋白水平进行检测,结果发现,DN 组的血清 IV 型胶原、层黏连蛋白水平明显高于非 DN 组,而且与 DN 的发生、发展有密切关系。Xu 等^[12]则证实高糖可诱导系膜细胞分泌更多的纤维连接蛋白。Egr-1 也可引起 ECM 的积聚。Shin 等^[10]研究证明,Egr-1 可通过上调系膜细胞中基质金属蛋白酶-9 基因的表达,抑制 ECM 降解,促进系膜外基质沉积,加重肾小球硬化。Gil 等^[24]通过体内和体外研究证实,糖尿病和高糖状态下 Egr-1 表达增加,活化的 Egr-1 启动了其下游乙酰肝素酶基因转录,使乙酰肝素酶表达增加。该酶能降解肾小球基底膜带负电荷的硫酸肝素,造成肾小球基底膜选择性滤过蛋白质功能下降,与 DN 蛋白尿的产生密切相关。

综上所述,Egr-1 作为重要的核转录因子参与 DN 的多个发病环节。但相关研究仍大多集中在细胞实验和少数动物实验上。而且缺乏针对 DN 动物

模型使用 Egr-1 基因敲除或特殊的 Egr-1 分子抑制剂,如反义寡核苷酸、诱骗寡核苷酸、siRNA 或 microRNA 等干预的研究。故应进行更深入的动物研究,探究 Egr-1 在 DN 中的作用。

参 考 文 献

- [1] 薛耀明. 糖尿病肾病诊治新进展[J]. 中国处方药, 2005, 6 (6): 58-61.
- [2] Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization[J]. Cell, 1988, 53 (1): 37-43.
- [3] Christy B, Nathans D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86 (22): 8737-8741.
- [4] Russo MW, Severson BR, Milbrandt J. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92 (15): 6873-6877.
- [5] Svaren J, Severson BR, Apel ED, et al. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16 (7): 3545-3553.
- [6] Sukhatme VP. The Egr transcription factor family: from signal transduction to kidney differentiation[J]. Kidney Int, 1992, 41 (3): 550-553.
- [7] Sabuda-Widemann D, Grabensee B, Schwandt C, et al. Mycophenolic acid inhibits the autocrine PDGF-B synthesis and PDGF-BB-induced mRNA expression of Egr-1 in rat mesangial cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24 (1): 52-61.
- [8] Gitenay D, Baron VT. Is EGR1 a potential target for prostate Cancer therapy[J]. Future Oncol, 2009, 5 (7): 993-1003.
- [9] Yan SF, Harja E, Andrassy M, et al. Protein kinase C beta/early growth response-1 pathway: a key player in ischemia, atherosclerosis, and restenosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48 (9 Suppl 1): A47-A55.
- [10] Shin SY, Kim JH, Baker A, et al. Transcription factor Egr-1 is essential for maximal matrix metalloproteinase-9 transcription by tumor necrosis factor alpha[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8 (4): 507-519.
- [11] Ghosh AK, Murphy SB, Kishore R, et al. Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis[J]. PLoS One, 2013, 8 (5): e63825.
- [12] Xu WW, Guan MP, Zheng ZJ, et al. Exendin-4 alleviates high glucose-induced rat mesangial cell dysfunction through the AMPK pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33 (2): 423-432.
- [13] 刘洁, 候明辉, 刘莉, 等. EGR-1 基因转染对环境中小鼠肾小球系膜细胞 TGF- β 及 PDGF-B 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28 (6): 497-501.
- [14] Hofer G, Grimmer C, Sukhatme VP, et al. Transcription factor Egr-1 regulates glomerular mesangial cell proliferation[J]. J Biol Chem, 1996, 271 (45): 28306-28310.
- [15] Carl M, Akagi Y, Weidner S, et al. Specific inhibition of Egr-1 prevents mesangial cell hypercellularity in experimental nephritis[J]. Kidney Int, 2003, 63 (4): 1302-1312.
- [16] Solow BT, Derrien A, Smith JA, et al. Angiotensin II inhibits insulin-induced egr-1 expression in mesangial cells[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 370 (2): 308-313.
- [17] Hasan RN, Phukan S, Harada S. Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23 (6): 988-993.
- [18] 曹艳丽, 王涤非, 孟馨, 等. 葡萄糖和肿瘤坏死因子- α 对内皮细胞中早期生长反应基因-1 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21 (3): 258-261.
- [19] Vedantham S, Thiagarajan D, Ananthakrishnan R, et al. Aldose reductase drives hyperacetylation of Egr-1 in hyperglycemia and consequent upregulation of proinflammatory and prothrombotic signals[J]. Diabetes, 2014, 63 (2): 761-774.
- [20] McCaffrey TA, Fu C, Du B, et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2000, 105 (5): 653-662.
- [21] Chen SJ, Ning H, Ishida W, et al. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281 (30): 21183-21197.
- [22] Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, et al. Introduction of DNA enzyme for Egr-1 into tubulointerstitial fibroblasts by electroporation reduced interstitial alpha-smooth muscle actin expression and fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats[J]. Gene Ther, 2002, 9 (8): 495-502.
- [23] Friedrich B, Janessa A, Artunc F, et al. DOCA and TGF-beta induce early growth response gene-1 (Egr-1) expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22 (5/6): 465-474.
- [24] Gil N, Goldberg R, Neuman T, et al. Heparanase is essential for the development of diabetic nephropathy in mice[J]. Diabetes, 2012, 61 (1): 208-216.
- [25] Han DC, Isono M, Hoffman BB, et al. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF-beta[J]. J Am Soc Nephrol, 1999, 10 (9): 1891-1899.
- [26] 李晨钟, 薛耀明, 沈洁. 2 型糖尿病患者血清细胞外基质水平与糖尿病肾病的关系研究[J]. 中国全科医学, 2004, 7 (21): 1558-1560.

(收稿日期: 2014-08-20)