

血管内皮细胞生长因子-一氧化氮轴与糖尿病肾病

任惠珠 周赛君

【摘要】 血管内皮生长因子(VEGF)-一氧化氮(NO)耦联被称为 VEGF-NO 轴,其对维持肾小球血管内皮细胞功能起重要作用,其解耦联可能参与糖尿病肾病的发生、发展。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性降低可能是糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的关键环节。肥胖、高脂血症以及氧化应激是导致糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的重要原因。脂联素、血红素加氧酶-1 明显改善糖尿病大鼠肾小球血管内皮细胞的功能、降低白蛋白尿,其机制可能是通过抗氧化应激作用改善 VEGF-NO 轴的功能。

【关键词】 糖尿病肾病;血管内皮细胞生长因子;一氧化氮;一氧化氮合酶;氧化应激

Vascular endothelial growth factor-nitric oxide axis and diabetic nephropathy Ren Huizhu, Zhou Sai-jun. Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health), The Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

【Abstract】 The coupling of vascular endothelial growth factor (VEGF) with nitric oxide (NO), known as the VEGF-NO axis, plays a critical role in maintaining normal glomerular endothelial cell function, its uncoupling involves in the occurrence and development of diabetic nephropathy. Reduction of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity is likely to be the key mechanism of VEGF-NO axial decoupling in diabetic kidney. Obesity, hyperlipidemia, and oxidative stress may be main reasons of VEGF-NO axis uncoupling in diabetes kidney. Adiponectin, heme oxygenase-1 could obviously improve glomerular endothelial cell function of diabetic rat, reduce proteinuria via resisting oxidative stress to improve the function of the VEGF-NO axis.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Oxidative stress

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35:354-356)

糖尿病是由不同病因和发病机制引起的体内胰岛素绝对或相对不足,导致糖、蛋白质和脂肪代谢紊乱,并以慢性高血糖为主要临床表现的全身性疾病^[1]。近 30 年来我国糖尿病患病率显著增加,患病人数居世界首位^[2]。糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一,是导致终末期肾功能衰竭的首要原因^[3]。一直以来足细胞损伤被认为是 DN 最重要的致病因素^[4]。新近研究表明,肾小球血管内皮细胞损伤在 DN 发生、发展中可能起更加关键的作用^[5]。血管内皮生长因子(VEGF)-一氧化氮(NO)耦联被称为 VEGF-NO 轴,此轴对维持肾小球血管内皮细胞功能起着积极重要的作用^[6]。VEGF-NO 轴解耦联被认为是 DN 重要的发病机制^[4]。大量体外实验证实,VEGF-NO 解耦联

可导致肾小球血管内皮细胞功能紊乱^[7-8]。动物实验亦表明,VEGF-NO 轴解耦联的糖尿病鼠可出现与人类 DN 极其相似的肾脏病变^[9]。因此,VEGF-NO 轴在 DN 的发生、发展中起重要作用。

1 VEGF 与糖尿病肾脏的关系

VEGF 是血管新生的关键因子,具有多种生理功能,在促进内皮细胞分化、增殖、迁移、血管重塑、调节血管通透性以及刺激血管内皮细胞分泌一氧化氮等方面起关键作用^[6]。肾组织中 VEGF 主要由肾小球脏层足细胞持续分泌,其次由远端肾小管和集合管分泌。VEGF 通过自分泌、旁分泌、胞内分泌的方式作用于肾小球血管内皮细胞,从而发挥促进肾小球血管修复、抑制肾小球内血栓形成、减少肾脏纤维化等多种生理功能^[10]。因此,VEGF 在维持肾脏正常的功能中起着不可或缺的作用。然而研究发现 VEGF 的过量表达与 DN 的进展呈正相关关系^[11]。动物实验证实 DN 早期肾脏 VEGF 及其受体表达均上调,且可能与 DN 早期肾小球对白蛋白通透性增

加有关^[12-13]。Hou 等^[14]通过诱导小鼠体内足细胞过表达 VEGF,可导致白蛋白尿产生,并随病程的延长出现足突融合、基底膜增厚、结节性肾小球硬化,这些表现与 DN 的表现一致。且采用抗 VEGF 抗体进行处理,可降低糖尿病尿白蛋白排泄、阻止肾小球高滤过^[15]。因此,减少 VEGF 或抑制其发挥作用,可延缓 DN 的进展。VEGF 在维持肾脏功能方面起重要作用,但是糖尿病肾脏中 VEGF 的大量表达可加重糖尿病肾脏的损伤,其原因可能与糖尿病肾脏中 VEGF-NO 轴的失调有关。

2 VEGF-NO 轴与 DN 的关系

VEGF 对肾脏的保护作用主要是通过促进内皮细胞产生一氧化氮实现^[15]。一氧化氮是一种半衰期很短的自由基分子,兼有第二信使和神经递质的功能,在许多生物反应和信号转导途径中发挥重要作用,尤其具有抗炎性反应、抗氧化应激等作用。一氧化氮对肾脏的保护机制表现为抑制黏附分子、发挥抗炎作用;抑制肾脏巨噬细胞、淋巴细胞浸润;防止血小板聚集和微血栓形成;抑制肾间质胶原沉积和抗纤维化;抑制血管平滑肌细胞增殖;促进血管舒张;调节入球小动脉和出球小动脉的管腔直径,改善肾血流动力学、控制肾小球压力等^[16]。一氧化氮是由血管内皮细胞在一氧化氮合酶催化作用下合成,其中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达直接影响循环中一氧化氮的生成量及生物活性。实验证实,在残肾大鼠模型中,给予 eNOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯后阻断一氧化氮的产生,可加剧肾脏损伤;而补充外源性一氧化氮可明显改善 VEGF 介导的肾损害^[17]。因此,VEGF 的保护性作用在于其可刺激内皮细胞释放一氧化氮,并且内皮细胞源性一氧化氮是内皮细胞增殖的负性调节因子,可反馈抑制 VEGF 的过量表达和 VEGF 诱导的内皮细胞过度增殖^[18]。糖尿病大鼠肾脏 VEGF 含量明显增加,而一氧化氮释放明显减少,并且 DN 损伤程度,可能随一氧化氮缺乏程度而加重,提示糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴功能的异常^[19]。Nakagawa 等^[9]于 2006 年首次提出“糖尿病肾脏内 VEGF-NO 轴解耦联是 DN 的重要发病机制”这一假说。Nakagawa 等^[9]利用 eNOS 基因敲除小鼠并采用链脲佐菌素诱导糖尿病后,小鼠出现严重的肾损害,并且与 DN 患者肾脏病变极其相似:不仅有 DN 的早期病变特征,还有 DN 的晚期特点,如系膜血管裂解、K-W 结节形成、小动脉玻璃样变、肾小球内胶原的沉积、肾小球硬化、肾间质纤维化、异常血管新生等病理改变,同时

还具有高血压、大量白蛋白尿以及进行性的肾功能衰竭,并伴随肾脏 VEGF 表达明显升高。而野生型 DN 鼠仅出现早期糖尿病肾损害的病理变化,即肾小球肥大、系膜增生和基底膜增厚。因此 eNOS 基因敲除的糖尿病小鼠模型不仅证实了 VEGF-NO 轴解耦联是 DN 重要的致病机制,还为研究 DN 提供了理想的动物模型。Nakagawa 等^[7]还采用重组 VEGF 刺激内皮细胞并加入一氧化氮阻断剂建立 VEGF-NO 解耦联的条件,证实 VEGF 和一氧化氮解耦联导致内皮细胞功能紊乱。Zhao 等^[20]通过动物实验亦证实糖尿病 VEGF-NO 轴解耦联是导致肾小球血管内皮细胞功能紊乱的重要机制。因此,糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联与 VEGF 导致的糖尿病肾脏损伤相关,是 DN 的重要发病机制。

3 糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的机制

3.1 糖尿病状态下 eNOS 活性异常

糖尿病肾脏 eNOS 活性下降是 VEGF-NO 轴解耦联的关键环节^[9]。eNOS 残基丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)的磷酸化和去磷酸化是调节 eNOS 活性的关键位点。其中 Ser177、Ser635 和 Ser617 位点的磷酸化可激活 eNOS,形成 eNOS 二聚体,而 Thr495 和 Ser116 磷酸化则抑制 eNOS 活性。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路使 Ser177 磷酸化激活 eNOS;蛋白激酶 C 和核因子- κ B 通路可经磷酸化 Thr495 和(或) Ser116,抑制 eNOS 活性^[21]。BH4 作为 eNOS 的关键辅助因子,对 eNOS 二聚化激活有重要作用。GCH-1 是 BH4 合成的关键酶,炎症反应可显著抑制 GCH-1 mRNA 的表达及蛋白的活性,从而导致 BH4 合成减少,eNOS 形成二聚体受抑制,使 eNOS 单体增加,而 eNOS 单体促进超氧化物的产生而不是生成一氧化氮,该途径被称为 eNOS 旁路^[22]。Komers 等^[23]研究证实,eNOS 的激活需要以二聚体的形式定位在细胞膜上,eNOS 在糖尿病肾脏中主要以单体、非活性形式存在于胞质。糖尿病肾脏 eNOS 活性降低的原因不是 eNOS 蛋白表达水平下调,而是 eNOS 二聚体形成障碍。因此,eNOS 活性异常是糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的环节,而 eNOS 旁路激活可通过加剧氧化应激导致肾损害的发生。

3.2 氧化应激与 VEGF-NO 轴解耦联

有研究证实,游离脂肪酸可通过抑制一氧化氮分泌,导致肥胖大鼠主动脉血管内皮细胞功能紊乱^[24]。提示高游离脂肪酸是导致糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的因素。新近动物实验亦证实,高游离脂肪酸血症通过介导 VEGF-NO 轴解耦联以及肾小球血管内皮细

胞的异常增殖,参与肥胖糖尿病大鼠白蛋白尿的发生、发展^[25]。并且,脂联素可通过降低游离脂肪酸的水平,有效改善糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴的功能,降低白蛋白尿水平^[26]。此外,激活肾脏血红素加氧酶-1,亦可显著改善肥胖糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴的功能^[6]。而抗氧化应激作用可能是脂联素和血红素加氧酶-1 对抗糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的机制。此外,有研究证实,抗氧化应激治疗可改善糖尿病大鼠肾脏 eNOS 的活性,从而改善糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的状况。其机制可能为氧化应激产物活性氧簇或活性氮产物通过刺激低氧诱导因子-1 α 产生以及激活 notch 信号转导通路,增加 VEGF 的生成。在正常状态下 VEGF 通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 或蛋白激酶 C 等途径激活 eNOS,促进一氧化氮生成。然而,当存在超氧化物时,一氧化氮迅速形成过氧亚硝酸盐,并且激活鸟苷酸环化酶,从而导致 eNOS 脱磷酸化失活^[27]。因此,氧化应激可能是糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联的关键机制,而 VEGF-NO 轴解耦联又可加剧氧化应激,从而形成恶性循环,加剧糖尿病肾脏的损伤。

综上所述,VEGF-NO 轴在维持肾脏结构和功能方面均起着重要的作用。在糖尿病状态下,高游离脂肪酸血症、脂联素缺乏、肾脏血红素加氧酶-1 活性下降等因素导致氧化应激加剧,进而导致 eNOS 失活和 VEGF-NO 轴解耦联、eNOS 旁路激活,从而进一步加剧肾脏氧化应激、肾小球血管内皮细胞的损伤、白蛋白尿的形成和发展。因此,明确 VEGF-NO 轴解耦联的机制并寻找有效的干预措施,可能为治疗 DN 找到一个有别于肾素-血管紧张素-醛固酮系统的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management[J]. *Lancet*, 2011, 378(9786):169-181.
- [2] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2):137-149.
- [3] Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database[J]. *Am J Kidney Dis*, 2012, 59(1):75-83.
- [4] Nakagawa T. Is endothelial dysfunction more deleterious than podocyte injury in diabetic nephropathy? [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6):1202-1203.
- [5] Gilbert RE. The endothelium in diabetic nephropathy[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2014, 16(5):410.
- [6] Liu X, Zang P, Han F, et al. Renal protective effects of induction of haem oxygenase-1 combined with increased adiponectin on the glomerular vascular endothelial growth factor-nitric oxide axis in obese rats[J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(7):865-876.
- [7] Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, et al. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013:184539.
- [8] von Leitner EC, Klinker A, Atzler D, et al. Pathogenic cycle between the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine and the leukocyte-derived hemoprotein myeloperoxidase[J]. *Circulation*, 2011, 124(24):2735-2745.
- [9] Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(2):539-550.
- [10] Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2014, 21(3):304-310.
- [11] Nazir N, Siddiqui K, Al-Qasim S, et al. Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways[J]. *BMC Med Genet*, 2014, 15:103.
- [12] El Eter EA, Al-Masri AA. Adrenomedullin mediates early phase angiogenesis induced diabetic nephropathy in STZ diabetic rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(22):3534-3543.
- [13] Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, et al. Vasopressin induces human mesangial cell growth via induction of vascular endothelial growth factor secretion[J]. *Neuropeptides*, 2011, 45(2):105-111.
- [14] Hou N, Huang N, Han F, et al. Protective effects of adiponectin on uncoupling of glomerular VEGF-NO axis in early streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2014, 46(10):2045-2051.
- [15] Feliers D, Chen X, Akis N, et al. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(4):1648-1659.
- [16] Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006, 187(4):433-446.
- [17] You H, Gao T, Cooper TK, et al. Arginase inhibition: a new treatment for preventing progression of established diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, [Epub ahead of print].
- [18] Deng J, Wu G, Yang C, et al. Rosuvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of nitric oxide, inflammatory responses, oxidative stress and apoptosis in diabetic male rats[J]. *J Transl Med*, 2015, 13:53.
- [19] Nakagawa T, Johnson RJ. Endothelial nitric oxide synthase[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170:93-101.
- [20] Zhao HJ, Wang S, Cheng H, et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(10):2664-2669.
- [21] Bauer PM, Fulton D, Boo YC, et al. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17):14841-14849.
- [22] Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3):413-420.
- [23] Komers R, Schutzer WE, Reed JF, et al. Altered endothelial nitric oxide synthase targeting and conformation and caveolin-1 expression in the diabetic kidney[J]. *Diabetes*, 2006, 55(6):1651-1659.
- [24] Li H, Li H, Bao Y, et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 152(2):218-224.
- [25] Sun X, Yu Y, Han L. High FFA levels related to microalbuminuria and uncoupling of VEGF-NO axis in obese rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(4):1197-1207.
- [26] Wang B, Yu Y, Han L. Adiponectin improves endothelial dysfunction caused by elevated FFAs levels, partially through cAMP-dependent pathway[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 97(1):119-124.
- [27] Nagano K, Ishida J, Unno M, et al. Apelin elevates blood pressure in ICR mice with L-NAME-induced endothelial dysfunction[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5):1371-1375.

(收稿日期:2015-03-13)