

骨桥蛋白在糖尿病肾病中作用的研究进展

刘丹,吴红艳

(长江大学附属第一医院内分泌科,湖北 荆州 434000)

摘要:骨桥蛋白是一种具有细胞黏附和信号转导功能的分泌型磷蛋白,研究发现它在糖尿病肾病中起重要作用。高糖和肾素血管紧张素系统等因素可以引起肾脏骨桥蛋白表达升高。骨桥蛋白主要通过巨噬细胞趋化、蛋白尿形成和肾脏纤维化等机制促进糖尿病肾病的发生和进展,抑制骨桥蛋白则可以改善糖尿病肾病。此外,骨桥蛋白基因多态性还与糖尿病肾病易感性相关。作为糖尿病肾病诊断和治疗的重要靶点,对骨桥蛋白的深入研究有助于阐明糖尿病肾病的发病机制,开发新的生物学诊断标记物和治疗药物。

关键词:骨桥蛋白;糖尿病肾病;蛋白尿;肾脏纤维化

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.005

Research progress of the role of osteopontin in diabetic nephropathy

LIU Dan, WU Hongyan

(Department of Endocrinology, Jingzhou First People's Hospital, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract: Osteopontin is a kind of secreted phosphoprotein with function of cell adhesion and signal transduction. It has been reported to play an important role in diabetic nephropathy. High glucose level and the renin angiotensin system can cause elevated osteopontin expression in kidney. Osteopontin promotes the occurrence and progress of diabetic nephropathy mainly through mechanisms such as macrophage chemotaxis, proteinuria and renal fibrosis; and inhibition of osteopontin can improve diabetic nephropathy. In addition, genetic polymorphism of osteopontin is also associated with susceptibility to diabetic nephropathy. As an important target in the diagnosis and treatment of diabetic nephropathy, in-depth study of osteopontin can contribute to the clarification of diabetic nephropathy pathogenesis and the development of new diagnostic biomarkers and therapeutic drugs.

Key words: Osteopontin; Diabetic nephropathy; Proteinuria; Renal fibrosis

糖尿病肾病(DN)是糖尿病(DM)常见的严重慢性血管并发症之一,并且已成为引起终末期肾病及糖尿病病死率升高的重要因素。骨桥蛋白(Osteopontin, OPN),又称为分泌性磷蛋白1(SPP1),44 kDa 骨磷蛋白、唾液酸蛋白、2ar、尿桥蛋白、早期T淋巴细胞激活物-1,它是一种分泌性基质细胞蛋白,1958年首次由Heingard等从牛的骨基质中发现^[1]。基因表达研究显示在各种DN模型中OPN的水平与糖尿病蛋白尿和肾小球硬化症的严重程度呈强相关^[2]。近10年来许多研究分析了OPN在DN中的发病机制,本研究就此作一综述。

1 OPN的结构和功能

OPN是带负电荷、富含天冬氨酸、N端糖基化的磷蛋白,由314个氨基酸残基组成,分子量大小为44 kD。作为SIBLING家族中的一员,它有2个

主要的整合素结合域, RGD 和 SVVYGLR 序列。OPN通过RGD结构域与含有 $\alpha 5$ 亚基的整合素结合,通过SVVYGLR(在小鼠中是SLAYGLR)结构域与整合素 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ 结合,介导细胞黏附和信号转导。OPN被凝血酶或基质金属蛋白酶(MMP)裂解后促进黏附和迁移的能力更强。

2 OPN在DN的表达和调控

在正常成人肾脏中,OPN主要位于远侧肾单位,在髓袢升支粗段中大量表达。OPN在DN大鼠和小鼠模型的肾皮质的小管上皮和肾小球中高度表达^[2]。人OPN基因位于4号染色体长臂(4q21-23),是一个约8 kb的单拷贝基因,由7个外显子和6个内含子构成,其启动子上存在高糖/葡萄糖胺应答元件、肾素血管紧张素系统(RAS)应答元件、转化生长因子- β (TGF- β)应答元件等,以及活化蛋白-1(AP-1)和核因子- κ B(NF- κ B)的结合位点,因此OPN的表达受多种因素调控。

2.1 高糖对OPN表达的调控 高糖可以刺激小

鼠系膜细胞表达 OPN 和 IV 型胶原,而且间断高糖刺激的效果较持续高糖刺激更为明显^[3]。PI3K/AKT/mTOR 通路在高糖对 OPN 表达的调控中起重要作用。研究者们^[4-5]发现证实高糖通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导人肾小管上皮细胞 OPN mRNA 表达,活化的 PI3K/AKT/mTOR 通路还参与糖尿病肾病中系膜基质增生、上皮间充质转化等病理改变,并损伤足细胞参与蛋白尿形成^[6]。

最近的研究还发现高糖可以对 OPN 基因的活性进行表观调控。体内试验和体外实验证实葡萄糖是 OPN 基因启动子区域组蛋白乙酰化和甲基化有力的诱导物,组蛋白乙酰化和甲基化可以导致 OPN 基因表达的上调^[7]。高糖的这种表观调控作用可以解释血糖控制不良对糖尿病并发症危险的长期效应,也就是代谢记忆效应。

2.2 RAS 刺激 OPN 表达的机制 Hsieh 等^[8]发现糖尿病大鼠肾脏近端小管(RPTs)和长期暴露在高糖中的永生肾脏近端小管细胞(IRPTCs)的 OPN 基因表达上调,通过微阵列分析他们提出一个高糖在 IRPTCs 中作用于 OPN 的分子机制:首先,高糖引起活性氧簇(ROS)生成,ROS 通过包括蛋白激酶 C- β 1(PKC- β 1)在内的各种信号转导通路刺激血管紧张素原和肾脏中血管紧张素 II(Ang II)形成;随后 Ang II 作用于血管紧张素 1 型受体(AT₁R)激活 PKC- β 1 信号转导,此外 Ang II 还可以通过刺激 NADPH 氧化酶引起 ROS 生成和刺激 TGF- β 1 基因表达进一步增强 PKC- β 1 的活性;最后,PKC- β 1 在糖尿病肾病中刺激 OPN 表达,导致肾脏纤维化和终末期肾病。

醛固酮通过盐皮质激素受体(MR)和盐皮质激素应答元件(MRE)的相互作用介导肾脏 OPN 的表达。Gauer 等^[9]在大鼠系膜细胞中识别出一个盐皮质激素应答元件(MRE),位于 OPN 编码序列上游 1984 碱基处,醛固酮通过 MR 与 MRE 的相互作用介导 OPN 的表达。Irita 等^[10]在大鼠肾脏成纤维细胞的 OPN 启动子中识别出一个负责对醛固酮应答的顺式调节元件(-2153 到 -1758),该元件含有一个 AP-1 和 NF- κ B 位点,醛固酮通过激活 AP-1 和 NF- κ B 诱导 MR 介导的 OPN 表达。醛固酮受体拮抗剂依普利酮可以减轻 1 型糖尿病(STZ 处理的大鼠)和 2 型糖尿病(db/db 小鼠)的肾损害以及 TGF- β mRNA 和 OPN mRNA 水平增加,但是不影响 MR 蛋白和 MR mRNA 水平增加,而且这种作用独立于血压和血糖^[11]。OPN 基因敲除对醛固酮诱导的肾脏炎症、氧化应激和间质纤维化具有

保护作用^[12]。

3 OPN 在 DN 的作用机制

DN 的发病机制并未完全阐明,普遍认为糖脂代谢紊乱、血流动力学改变、氧化应激、炎症介质产生、遗传易感性等多因素协同参与疾病的发生及发展,引起细胞外基质蓄积、基底膜增厚、肾小球硬化等病理改变。在 DN 中,OPN 参与巨噬细胞趋化、蛋白尿形成和肾脏纤维化等多个环节。

3.1 OPN 趋化巨噬细胞 巨噬细胞在 DN 的小管间质损伤中起重要作用。OPN 通过 SLAYGLR 功能域与整合素 α 4 和 α 9 的相互作用调节巨噬细胞的迁移、存活和蓄积^[13]。巨噬细胞也可以产生 OPN,OPN 反过来刺激 MCP-1 的生成,导致巨噬细胞蓄积。此外,巨噬细胞还可以通过产生 MMP9 裂解 OPN 增强其对巨噬细胞的趋化能力^[14]。因此,OPN 作为一个重要的巨噬细胞趋化因子,在 DN 中直接地或间接地起作用。

巨噬细胞在组织中有 M1 和 M2 两种亚型^[15],M1 型巨噬细胞大量表达促炎细胞因子,增强组织炎症应答,而 M2 巨噬细胞大量表达抗炎细胞因子,诸如 IL-10,促进组织修复,增强成纤维细胞的纤维化。M1 和 M2 型巨噬细胞标志基因的表达在糖尿病肾病小鼠的肾皮质中都上调,两者都参与 DN 的发展^[16]。Nagao 等^[17]的研究证实 OPN 在 STZ 诱导的 DN 中既诱导 M1 型巨噬细胞,也诱导 M2 型巨噬细胞。

3.2 OPN 参与蛋白尿形成 临床研究和动物实验均证实 OPN 与 DN 的蛋白尿相关。Yamaguchi 等^[18]对 229 名日本 2 型糖尿病合并 DN 患者的研究显示血清 OPN 水平升高与尿蛋白增加呈一致性,与血压、血糖、血脂水平均不相关。Lorenzen 等^[19]发现 1 型[Ins2(Akita)]糖尿病肾病小鼠模型的肾脏 OPN mRNA 升高,该模型还出现显著的蛋白尿增多和系膜扩张,而 OPN 基因敲除小鼠则不会出现糖尿病诱导的蛋白尿和系膜扩张。Nicholas 等^[20]将 1 型[Ins2(Akita)]和 2 型糖尿病(db/db 小鼠)的 OPN 基因敲除后也观察到类似的结果。

OPN 在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的介导下通过增加足细胞运动性参与蛋白尿的形成。体外实验中的足细胞运动性增加相当于体内的足突消失^[19,21]。Lorenzen 等^[19]发现 OPN 在足细胞中激活 NF- κ B,增加尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)的表达和足细胞运动性,而 NF- κ B 通路抑制剂可以阻断 OPN 诱导的足细胞运动性增加。足细胞运动性增加还需要整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 uPA 受体活化参与^[21]。机械保护性

OPN 信号转导级联反应在足细胞运动性增加中起重要作用。Schordan 等^[22]的研究证实 OPN 与整合素 α_v 结合后通过激活 FAK、Src、MAPK 和 PI 3 激酶参与机械保护性 OPN 信号转导级联反应,导致足细胞的细胞骨架重组,诱导以应力纤维和黏着斑大小的减少为特征的足细胞运动表型,这种运动表型允许足细胞在对机械性牵张的应答中快速地识别肌动蛋白细胞骨架。OPN 的这种机械保护性功能是一种非冗余功能,它原本是足细胞对于糖尿病早期肾小球高压的一个保护性应答,但是蛋白尿这一副作用在远期会损害足细胞。

3.3 OPN 促进肾脏纤维化 温宇明^[23]对不同分期糖尿病患者肾脏活检组织的肾小管间质中 OPN 表达的比较显示,与无糖尿病组比较,早期糖尿病肾病组及临床糖尿病肾病组的肾系膜区扩大及基质增多,肾小球逐渐硬化,且肾组织 OPN 表达增多,在临床糖尿病肾病组更加明显,提示 OPN 促进肾脏纤维化。

OPN 在整合素 β_3 的介导下^[3]直接作用于系膜细胞,激活 ERK/MAPK 和 JNK 信号转导通路,刺激 TGF- β 的生成,继而促进细胞外基质 (ECM) 沉积,导致肾脏纤维化^[20]。将糖尿病小鼠的 OPN 基因敲除后,TGF- β 明显减少^[20]。TGF- β_1 信号转导是公认的导致 DN 的通路^[24-25],它介导慢性肾脏病进展中的几个关键性的小管病理事件:成纤维细胞增生、内皮间叶化生、小管和成纤维细胞的 ECM 生成以及内皮细胞死亡,从而导致小管细胞缺失和间质纤维化^[26]。此外,TGF- β_1 还可以促进系膜细胞增生增加 ECM 生成,诱导小管上皮细胞和足细胞凋亡,导致肾损伤恶化,引发更加严重的肾纤维化^[27]。

4 OPN 基因多态性与 DN

OPN 基因已经被证明是印度人 2 型糖尿病合并 DN 的一个新的候选基因。2012 年,Cheema 等^[28]在对于 1 115 名印度 2 型糖尿病患者的研究中观察到 OPN 启动子区域 C-443T 多态性的 T 等位基因和 TT 基因型的携带者 DN 的发病风险增加了几乎 3 倍。2015 年,Cheema 等^[29]在 1 165 名印度 2 型糖尿病患者中的研究中再次证实了上述位点与 DN 的相关性,此外还发现-156G 等位基因、GG 基因型 (delG-156G)、单体型 G-C-G 和 T-C-G (G-66T、C-443T、delG-156G) 与 DN 的危险减少和 eGFR 的增高存在关联;单体型 G-T-delG 和 T-T-delG (G-66T、C-443T、delG-156G) 与 eGFR 下降相关,是危险单体型。然而,OPN 基因的 SNP 位点与 DN 的

相关性在其他种族中是否具有差异性仍不清楚。

5 OPN 与 DN 的检测和治疗

5.1 OPN 与 DN 的检测 Al-Malki^[30]的研究发现糖尿病微量蛋白尿患者的尿液骨桥蛋白水平显著高于糖尿病正常蛋白尿患者和非糖尿病患者,他们认为尿液 OPN 可以作为 DN 的预测性诊断因子,而且尿液 OPN 与尿液足细胞计数和 IgM 联合起来对于 DN 的早期诊断的效果更好。国内外多项研究均证实血清 OPN 与糖尿病患者尿蛋白的增加呈正相关^[18,31]。因此,血清 OPN 可以作为衡量 DN 进展的指标。

5.2 OPN 与 DN 的治疗 目前临床上有多种药物以 OPN 为靶点保护 DN。ACEI 类或 ARB 类药物可以抑制 RAS 系统活性,下调 OPN 表达,同时减少蛋白尿,是经典的 DN 治疗药物。噻唑烷二酮类^[20,32]药物也可以通过减少 Ang II 所致的 OPN 升高减少 DN 的蛋白尿。醛固酮受体拮抗剂^[12]则是通过阻滞 MR 介导的 OPN 表达保护 DN。

肝 X 受体 (LXR) 是白细胞中一个重要的葡萄糖代谢和免疫功能的脂肪依赖性调节器。以往的研究发现人工合成的 LXR 配体可以抑制细胞因子诱导的巨噬细胞中 OPN 的表达。最近 Tachibana 等^[33]的研究则证实 LXR 激活可以抑制 OPN 基因启动子 AP-1 依赖性转录,从而下调近曲小管上皮细胞的 OPN 表达。动物实验显示 LXR 激动剂 T0901317 治疗后糖尿病小鼠的尿蛋白排泄减少,巨噬细胞浸润、系膜基质积累和间质纤维化也明显减轻,这一现象与肾皮质中 OPN 表达的减少平行,表明 LXR 的激活对肾 OPN 的抑制是 DN 的治疗靶点。

此外,OPN 特异性抗体^[3]、免疫抑制剂^[34-35]及反义寡核苷酸等都可以通过直接或间接的方式抑制 OPN 的表达,改善糖尿病肾脏病变。但是这些研究大多数集中在动物试验中,如何在临床中应用还需要更多的研究支持。

综上所述,高糖和 RAS 等因素可以引起肾脏 OPN 表达升高。OPN 主要通过巨噬细胞趋化、蛋白尿形成和肾脏纤维化等机制促进 DN 的发生和进展,抑制 OPN 则可以改善 DN。此外,OPN 多态性还与 DN 易感性相关。作为 DN 诊断和治疗的重要靶点,对 OPN 的深入研究有助于阐明 DN 的发病机制,开发新的生物学诊断标记物和治疗药物。

参考文献

- [1] Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes [J].

- Mol Metab,2014,3(4):384-393.
- [2] Susztak K,Böttinger E,Novitsky A,et al. Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease[J]. Diabetes,2004,53(3):784-794.
- [3] Sun J,Xu Y,Deng H,et al. Involvement of osteopontin upregulation on mesangial cells growth and collagen synthesis induced by intermittent high glucose[J]. J Cell Biochem,2010,109(6):1210-1221.
- [4] Junaid A,Amara FM. Osteopontin; correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells[J]. Histopathology,2004,44(2):136-146.
- [5] 王凤梅,蒋国国,张桂霞,等. 高糖激活 PI3K/AKT/mTORC1 通路诱导人肾小管上皮细胞骨桥蛋白的表达[J]. 中国药理学通报,2014,30(8):1156-1160.
- [6] Inoki K,Mori H,Wang JY,et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice[J]. J Clin Invest,2011,121(6):2181-2196.
- [7] Cai M,Bompada P,Atac D,et al. Epigenetic regulation of glucose-stimulated osteopontin (OPN) expression in diabetic kidney[J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,469(1):108-113.
- [8] Hsieh TJ,Chen R,Zhang SL,et al. Upregulation of osteopontin gene expression in diabetic rat proximal tubular cells revealed by microarray profiling[J]. Kidney Int,2006,69(6):1005-1015.
- [9] Gauer S,Hauser IA,Obermüller N,et al. Synergistic induction of osteopontin by aldosterone and inflammatory cytokines in mesangial cells[J]. J Cell Biochem,2008,103(2):615-623.
- [10] Irita J,Okura T,Kurata M,et al. Osteopontin in rat renal fibroblasts: functional properties and transcriptional regulation by aldosterone[J]. Hypertension,2008,51(2):507-513.
- [11] Guo C,Martinez-Vasquez D,Mendez GP,et al. Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus[J]. Endocrinology,2006,147(11):5363-5373.
- [12] Irita J,Jotoku M,Okura T,et al. Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2011,301(4):833-844.
- [13] Lund SA,Wilson CL,Raines EW,et al. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via $\alpha 4$ and $\alpha 9$ integrins and survival via the $\alpha 4$ integrin[J]. J Cell Biochem,2013,114(5):1194-1202.
- [14] Tan TK,Zheng G,Hsu TT,et al. Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage[J]. Lab Invest,2013,93(4):434-449.
- [15] Wang Y,Harris DC. Macrophages in renal disease[J]. J Am Soc Nephrol,2011,22(1):21-27.
- [16] Suzuki H,Kato I,Usui I,et al. Characterization of diabetic nephropathy in CaM kinase II α (Thr286Asp) transgenic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,379(1):38-42.
- [17] Nagao T,Okura T,Irita J,et al. Osteopontin plays a critical role in interstitial fibrosis but not glomerular sclerosis in diabetic nephropathy[J]. Nephron Extra,2012,2(1):87-103.
- [18] Yamaguchi H,Igarashi M,Hirata A,et al. Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients[J]. Endocr J,2004,51(5):499-504.
- [19] Lorenzen J,Shah R,Biser A,et al. The role of osteopontin in the development of albuminuria[J]. J Am Soc Nephrol. J Am Soc Nephrol,2008,19(5):884-890.
- [20] Nicholas SB,Liu J,Kim J,et al. Critical role for osteopontin in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int,2010,77(7):588-600.
- [21] Wei C,Möller CC,Altintas MM,et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor[J]. Nat Med,2008,14(1):55-63.
- [22] Schordan S,Schordan E,Endlich K,et al. AlphaV-integrins mediate the mechanoprotective action of osteopontin in podocytes[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2011,300(1):F119-F132.
- [23] 温宇明. 骨桥蛋白在不同分期糖尿病肾病患者肾组织中的表达[J]. 岭南急诊医学杂志,2012,17(3):184-186.
- [24] Cooper ME. Diabetes; treating diabetic nephropathy-still an unresolved issue[J]. Nat Rev Endocrinol,2012,8(9):515-516.
- [25] Abdel-Rahman EM,Saadulla L,Reeves WB,et al. Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: standard and emerging approaches[J]. J Gen Intern Med,2012,27(4):458-468.
- [26] López-Hernández FJ,López-Novoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. Cell Tissue Res,2012,347(1):141-154.
- [27] Meng XM,Tang PM,Li J,et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. Front Physiol,2015(6):82.
- [28] Cheema BS,Iyengar S,Ahluwalia TS,et al. Association of an osteopontin gene promoter polymorphism with susceptibility to diabetic nephropathy in Asian Indians[J]. Clin Chim Acta,2012,413(19/20):1600-1604.
- [29] Cheema BS,Iyengar S,Sharma R,et al. Association between osteopontin promoter gene polymorphisms and haplotypes with risk of diabetic nephropathy[J]. J Clin Med,2015,4(6):1281-1292.
- [30] Al-Malki AL. Assessment of urinary osteopontin in association with podocyte for early predication of nephropathy in diabetic patients[J]. Dis Markers,2014(1):251-278.
- [31] 张宁,李全民. 糖尿病肾病患者血清骨桥蛋白检测的临床意义[J]. 中国医学工程,2012,20(5):86-87.
- [32] 张筠,王建平,臧丽,张世静. 吡咯列酮对 2 型糖尿病肾病患者骨桥蛋白和尿微量白蛋白的影响[J]. 实用医学杂志,2012(16):2772-2774.
- [33] Tachibana H,Ogawa D,Matsushita Y,et al. Activation of liver X receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2012,23(11):1835-1846.
- [34] 罗利彬,刘彬,王慧慧,等. 雷帕霉素对糖尿病肾病大鼠组织 TGF- $\beta 1$ 及 OPN 表达的影响[J]. 黑龙江医学科学,2012,35(5):5-6.
- [35] 苏双全. 他克莫司对糖尿病大鼠肾组织巨噬细胞浸润、增殖及活化的影响[D]. 合肥:安徽医科大学,2012.