

phropathy; a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(3):660-666.

- [13] Koya D, Haneda M, Inomata S, et al. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy; a randomized controlled trial[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(10):2037-2045.
- [14] Ciarambino T, Castellino P, Paolisso G, et al. Long term effects of low protein diet on depressive symptoms and quality of life in elderly Type 2 diabetic patients[J]. *Clin Nephrol*, 2012, 78(2):122-128.
- [15] Ciarambino T, Ferrara N, Castellino P. Effects of a 6-days-a-week low protein diet regimen on depressive symptoms in young-old type 2 diabetic patients[J]. *Nutrition*, 2011, 27(1):46-49.
- [16] De Santo NG, Perna A, Cirillo M. Low protein diets are mainstay for management of chronic kidney disease[J]. *Front Biosci(Schol Ed)*, 2011, 1(3):1432-1442.
- [17] Ambühl PM. Protein intake in renal and hepatic disease [J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2011, 81(2/3):162-172.
- [18] Aparicio M, Chauveau P, Précigout V, et al. Nutrition and outcome on renal replacement therapy of patients with chronic renal failure treated by a supplemented very low protein diet[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(4):708-716.
- [19] Zhu N, Yuan W, Zhou Y, et al. High mobility group box protein-1 correlates with microinflammatory state and nutritional status in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients[J]. *J Artif Organs*, 2011, 14(2):125-132.
- [20] Musso CG, Michelangelo H, Reynaldi J, et al. Combination of oral activated charcoal plus low protein diet as a

new alternative for handling in the old end-stage renal disease patients[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2010, 21(1):102-104.

- [21] Aparicio M, Cano NJ, Cupisti A, et al. Keto-acid therapy in predialysis chronic kidney disease patients: consensus statements[J]. *J Ren Nutr*, 2009, 19(5 Suppl):S33-35.
- [22] de Mello VD, Zelmanovitz T, Azevedo MJ, et al. Long-term effect of a chicken-based diet versus enalapril on albuminuria in type 2 diabetic patients with microalbuminuria[J]. *J Ren Nutr*, 2008, 18(5):440-447.
- [23] Gross JL, Zelmanovitz T, Moulin CC, et al. Effect of a chicken-based diet on renal function and lipid profile in patients with type 2 diabetes. A randomized crossover trial[J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(4):645-651.
- [24] de Mello VD, Zelmanovitz T, Perassolo MS, et al. Withdrawal of red meat from the usual diet reduces albuminuria and improves serum fatty acid profile in type 2 diabetes patients with macroalbuminuria[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(6):1032-1038.
- [25] Shapiro H, Theilla M, Attal-Singer J, et al. Effects of polyunsaturated fatty acid consumption in diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(2):110-121.
- [26] Esposito K, Kastorini CM, Panagiotakos DB, et al. Prevention of type 2 diabetes by dietary patterns; a systematic review of prospective studies and meta-analysis [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2010, 8(6):471-476.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-11-15)

· 综 述 ·

维甲酸与 Wnt/ β -catenin 通路及肾纤维化的关系

杜 轩, 涂卫平[△]

(南昌大学第二附属医院肾内科, 南昌 330006)

关键词: 维甲酸; Wnt/ β -catenin 信号; 肾间质纤维化; 肾小管上皮细胞转分化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.047

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0376-03

维甲酸 (retinoid acid, RA) 是维生素 A (VitA) 代谢的产物, 作为急性早幼粒白血病 (APL) 的治疗药物已广泛用于血液科临床。随着学科交叉的发展, 近年来 RA 在肾脏疾病中的前景越来越受到学者们的关注, 发现对诸多肾脏疾病动物模型都存在保护效应, 尤其是针对肾间质纤维化与肾小球硬化等领域, 但具体是通过哪些机制通路尚不明确。在诸多信号途径中, Wnt/ β -catenin 通路及肾纤维化关系极为密切。国内国外针对肿瘤、发育领域及肾脏以外很多器官研究均提示 RA 能够干预 Wnt 通路, 同时, 人体肾脏表达着许多亚型的 RA 受体类别, 推测 RA 对肾纤维化的影响可能与 Wnt 及其相关蛋白有联系。但 Wnt 信号在肾纤维化发生、发展中究竟发挥何种作用? RA 又能干预 Wnt 体系的哪些环节层面? RA 能否成为抗肾纤维化的前景药物? 上述问题均值得深入探讨。

1 RA 及其核受体 (nuclear receptor, NR) 的基本机制

经吸收后的 RA 可转为全反式维甲酸 (All-trans-retinoic acid), 发挥生物效应主要是通过其“核受体”来介导。RA 作为脂溶性的配体穿过由脂类构成的胞膜, 之后便与“核受体”结合从而引发靶启动因子转录及其他生物效应。RA 相关核受体有两种: RA 受体 (RARs)、视黄醇 X 受体 (RXRs), 其中每一个受体又存在 3 种异构体。RARs 和 RXRs 两者往往形成异质二聚体, 与特异性“RA 反应元件”(RARE) 结合, 启动靶基因的转录。除此之外, RXR 还能够以同质二聚体或者与其他 NR 成员形成异质二聚体发挥效应。

2 Wnt/ β -catenin 信号及其在肾硬化中的作用

作为物种进化过程中一条较保守的转导通路, Wnt 体系广泛影响着诸多生理病理过程。其成员涵盖: wnt 相关蛋白,

β -catenin 连环蛋白, 蓬乱蛋白 Dishevelled, Frizzled 及 LRP, GSK-3 β 激酶, T 因子及淋巴增强子, APC 蛋白, 支架 Axin 蛋白。在机体诸多细胞及器官中 wnt 均有广泛表达, 到目前为止, 发现的 wnt 蛋白亚型多达 10 余种, 其中 wnt1、wnt 8 及 wnt 3a 在经典途径中发挥关键作用^[1]。wnt 配体结合对应的受体及 frizzled 蛋白, 随后便活化蓬乱蛋白 Dishevelled, 进而糖原合成激酶-3 β 受到抑制并阻遏“ β -连环蛋白降解复合体”生成^[2]。以往对经典 Wnt/ β -catenin 的认识基本来源于肿瘤研究, 尤其是在调控细胞生长、增殖和凋亡以及组织发育领域, 近年 Wnt 信号在肾病领域的实验涉及肾脏发育、肾肿瘤、急性肾损伤修复等角度, 但是最突出的也是研究最多的是对肾纤维化的保护作用。He 等^[3] 研究显示, Wnt 信号转导通路在肾间质纤维化的发生、发展的多个环节发挥着多项作用。

正常机体肾脏中 Wnt 信号基本上是静默的^[4], 细胞质里仅存在极微量游离状态的 β -catenin, 在细胞膜, 绝大多数 β -catenin 与 E-cadherin 构成复合体。通过借助单侧输尿管梗阻 UUO 模型, Surendran 等^[5] 证实了在纤维化的肾间质周边, 除了呈现胶原及 α -SMA 的高表达, 还同时伴有 wnt 蛋白水平的升高; 针对成纤维细胞的研究发现: wnt 可以诱使其 β -catenin 连环蛋白入核; 且在肾脏病理状态下, 肾小管上皮及间质的 β -catenin 也被激活。 β -catenin 在细胞-细胞间连接黏附中发挥了关键性的作用, 这对肿瘤细胞转移浸润方面有重要的意义, 而恰恰肾小管上皮细胞转分化 EMT 步骤中包含了“上皮细胞失去黏附性”以及“细胞游走侵袭能力增强”等多个不良环节, 这是否与肿瘤领域中上皮细胞的生物学行为类似? 在肾和肿瘤中 β -catenin 是否扮演着同等的角色? Bienz 等^[6] 通过鼠肾 UUO 模型观察到了 wnt 体系的激活及 wnt1、wnt3a、wnt4 等诸多靶蛋白的升高; 同时高表达的还有淋巴增强子、金属基质蛋白酶-7 等。此外 Lin 等^[7] 将肾组织经过高糖诱导, 发现 wnt 蛋白以及 p-糖原合成激酶-3 β 均有不同水平的升高。

3 RA 及其 NR 对 Wnt 信号的影响

肾脏表达的 RA 的 NR 亚型中主要包括 RAR- α 及 RAR- β 。NR 和 Wnt/ β -catenin 体系之所以维持在一个平衡状态, 其原因主要有两方面: (1) β -连环蛋白激活核受体; (2)核受体抑制 β -catenin 及下游 Tcf 转录。周宝尚等^[8] 建立针对 β -catenin 靶位的专一性 shRNA 干扰性载体, 随后以此转染 TGF- β 1 诱导的 HK 细胞, 发现能通过阻滞肾小管上皮细胞向间质转分化, 进而延缓肾硬化。迄今为止, 能够肯定的与肾纤维化有关的基因有 twist 基因、金属基质蛋白酶-7、E-cadherin 及 fibronectin 等。Kim 等^[9] 在研究肥胖邻域已经证实 RA 通路 (RA-pathway) 与 Wnt 通路 (Wnt-signaling) 存在相互作用。作为 NR 成员的重要代表, RAR 和 RXR 与 Wnt 信号的作用发生在 β -catenin 及支架蛋白 axin 层面, 随后激活下游 RA 启动子反应元件^[10]。Koop 等^[11] 筛选了脊椎生物原肠胚期 RA-pathway 靶基因, 他们发现 wnt3 是 RA 信号的间接受体, RA 高表达能够直接使 wnt3 的水平升高。Jacobs 等^[12] 在 atRA 诱导大鼠胚胎神经干细胞 (NSCs) 分化为神经元的过程中发现 wnt 转导途径启动, 且和 NSCs 的分化呈现正性调控。除了上述发育/分化领域之外, Shah 等^[13] 在肿瘤里也发现 RA 能降低 β -catenin, 阻遏 TCF 等下游因子的生物活性; β -catenin 和 RAR 核受体是以一种 RA 依赖的方式互相发生直接效应, RA 核受体与 TCF 两者对 β -catenin 的结合是竞争性的, 导致细胞增殖受到阻滞。不仅如此, 肾纤维化中 Wnt 途径与 TGF- β 1 通路、PI3K/Akt 通路和整合素连接酶 ILK 之间存在着重要的

“crosstalk 对话”。TGF- β 1 能诱导 wnt 蛋白的分泌, 在激活 PI3K-Akt 途径和 ILK 的同时, 还能直接使糖原合成激酶-3 β 发生磷酸化, 使其活性受到抑制, 最终导致“ β -catenin/TCF-转录复合物”及相关转录因子激活, 介导 EMT 过程^[14]。Lim 等^[15] 证明 RA 在头颈部肿瘤中具有调控细胞间黏附的作用, 同时还能够维持 β -catenin 的稳定性和表达位置。经典的肾纤维化 TGF- β /Smad 信号通路中成员 Smad3 及 Smad4 能够与 β -catenin、T 细胞因子/淋巴增强因子结合, 促进 Wnt-TGF β 两信号间相互作用, 这就为 RA 同时干预 wnt 及 TGF- β 提供了生物基础^[16-17]。Jianrong 等^[18] 在胶质瘤的研究中同样观察到 RA 能阻遏 β 连环蛋白进入细胞核, 最终导致 β -catenin/TCF 转录水平下调。Wnt 系统中支架蛋白 axin 是一个关键的负性调节因子, 而 RA 恰恰能够上调 axin 的 mRNA 及其蛋白的表达, 这就自然成为了 RA 负性调控 wnt 体系的物质基础。

不过目前专门针对肾小管上皮细胞 (HK) 的实验还很匮乏, 较为接近的研究是针对猪支气管上皮细胞; 李媛等^[19] 发现 RA 处理以后支气管上皮细胞核内蛋白 β -catenin 水平下降, 证明进入细胞核的数量也减少; 且伴随 RA 剂量增加, 核内 β -catenin 表达程度的下降也呈剂量依赖性。Uemura 等^[20] 已经明确 RA 核受体的潜在机制在调控 β -catenin 蛋白的降解中发挥关键性的作用。但是核受体 (NR) 和 β -catenin 之间联系的共同池存在哪里? 什么因素把 RA 受体和 Wnt/ β -cat 这两者关联起来? 纵览 β -catenin 整个信号传导过程, 因为它的降解同时存在三方面去路即 Wnt 途径、核受体途径及 p53 途径, 推测这里的汇集可能为 NR 与 Wnt 之间架起了连接的桥梁, 可能也是 RAR 及 RXR 与 Wnt 相互作用的基础。综上所述, RA 介导的核受体信号转导通路与 Wnt/ β -catenin 体系之间存在着 talkcross 相互作用, 共同调节组织的增殖与凋亡。

不过还存在与上述相反的结论。Mulholland 等^[21] 研究显示 RA 对 β -catenin 及 TCF 转录存在双向性效应: 作用于 RAR 和 RXR 两类受体时效效应恰恰相反, 配体受体不同可能表现为抑制或者激活, 这受到很多因素的影响; 不同部位 RAR/RXA 或者 RXR/RXR 受体分布的比例、黏附因子水平及活性不同、Wnt 蛋白亚型不同、 β -catenin 亚型不同。因为肾脏本身表达的 RA 核受体亚型有多种, 所以肿瘤领域 RA 的正/负性效应不一定意味着对肾纤维化存在激活亦或阻遏 β -catenin。值得我们关注的是, RA 受体与配体 DNA 反应元件对应结合, 在转录水平上经历“反馈调节”来协调, 这使得 RA 与 Wnt 的关系可能存在多样性, 况且 RAR 和 RXR 还受到辅激活因子和辅抑制因子的调节, 再加上 RA 与其他核受体一样同时受诸多生长因子及激素的体液调节, 这更加大了我们研究 RA 与 Wnt 关系的难度。

4 展 望

除肾硬化以外, Wnt/ β -catenin 信号与肝脏、心肺及皮肤等许多器官纤维化的进展均密切相关^[22-23]。Wnt/ β -catenin 体系通过抑制 GSK3- β 来促进上皮间叶转化 (EMT), 而这里的 EMT 主要指肿瘤细胞浸润转移过程的, 如果完全将此“肿瘤侵袭 EMT”结论推衍于“肾小管上皮 EMT”, 可靠性及正确性还有待于进一步证实。RA 干预 Wnt/ β -cat 的实验包括机制方面的推测大都引申自除肾脏以外的其他器官 (且体外研究居多)^[24], 专门针对肾纤维化中 Wnt 的 RA 实验目前国内外均较少。不同部位器官、时相各异的组织、细胞行为的共性及受体分布上难免存在差异, 再加上 RA 除核受体途径外还可通过“非核受体途径”参与诸多转录因子的调节^[25], 可见 RA 对

Wnt 的干预还涉及纤维化中的时间特异性及肾器官特异性。不同生物信号和 β -catenin 如何协调? RAR/RXR 对配体刺激如何应答? 肾比其他器官的纤维化存在哪些不同点? 目前以 Wnt 体系分子为靶向的干扰剂已成为抗肿瘤的候选药物, 未来 Wnt 拮抗剂同样可能成为抗肾硬化的手段。随着对 RA 及其他 VitA 代谢物研究的深入, 也会帮助我们进一步揭示肾纤维化的发病机制, 尝试为临床延缓或阻止终末期肾病提供可能的新的靶位。

参考文献:

- [1] Chien AJ, Conrad WH, Moon RT. A Wnt survival guide: from flies to human disease[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(7):1614-1627.
- [2] Mi K, Dolan PJ, Johnson GV. The low density lipoprotein receptor related protein 6 interacts with glycogen synthase kinase 3 and attenuates activity[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8):4787-4794.
- [3] He W, Dai C, Li Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis [J]. *Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4):765-776.
- [4] He X. Cilia put a brake on Wnt signaling[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(1):11-13.
- [5] Surendran K, Schiavi, Hruska KA. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction and recombinant secreted frizzled related protein 4 alters the progression of renal fibrosis[J]. *Am Soc Nephrol*, 2005, 16(8):2373-2384.
- [6] Bienz M. Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(2):1764-1767.
- [7] Lin CL, Wang JY, Ko JY, et al. Superoxide destabilization of β -catenin augments apoptosis of high glucose stressed mesangial cells [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(6):2934-2942.
- [8] 周宝尚, 张璟, 陶光利. shRNA 干扰 β -catenin 对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞转分化的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(20):2166-2169.
- [9] Kim DM, Choi HR, Park A, et al. Retinoic acid inhibits adipogenesis via activation of Wnt signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(3):455-459.
- [10] Tice DA, Szeto W, Soloviev I, et al. Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(16):14329-14335.
- [11] Koop D, Holland ND, Sémon M, et al. Retinoic acid signaling targets Hox genes during the amphioxus gastrula stage; insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan [J]. *Deve Biol*, 2010, 338(1):98-106.
- [12] Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, et al. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(10):3902-3907.
- [13] Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V, et al. The role of cadherin, β -catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(28):25313-25322.
- [14] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5):548-558.
- [15] Lim YC, Kang HJ, Kim YS, et al. All-trans-retinoic acid inhibits growth of head and neck cancer stem cells by suppression of Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(17):3310-3318.
- [16] Nawshad A, Medici D, Liu CC, et al. TGF- β inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(9):1646-1653.
- [17] Vincent T, Neve EP, Johnson JR, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(8):943-950.
- [18] Jianrong Lu, Feng Zhang, Daqing Zhao, et al. ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of β -catenin via up-regulation of Axin [J]. *J Neurooncol*, 2008, 87:271-277.
- [19] 李媛, 吴人亮, 王曦, 等. 维甲酸对培养的猪支气管上皮细胞 β -连环素/Tcf 信号途径的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(13):1130-1131.
- [20] Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, et al. Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling [J]. *J Neur Res*, 2003, 73(2):166-175.
- [21] Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, et al. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ β -catenin/Tcf signaling axis; Wnt you like to know? [J]. *Endocri Rev*, 2005, 26(7):898-915.
- [22] Colston JT, de la Rosa SD, Koehler M, et al. Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3):1839-1846.
- [23] Bayle J, Fitch J, Jacobsen K, et al. Increased expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk mouse skin; role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(4):871-881.
- [24] Zhou TB, Qin YH, Li ZY, et al. All-Trans Retinoic Acid Treatment Is Associated with Prohibitin Expression in Renal Interstitial Fibrosis Rats [J]. *Mol Sci*, 2012, 13:2769-2782.
- [25] Osz J, Brélivet Y, Peluso-Iltis C, et al. Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(10):588-594.