

硫酸软骨素和硫酸软骨素蛋白多糖在糖尿病肾病中的研究进展

张敏 胡纯 吴小燕

430071 武汉, 武汉大学中南医院肾内科(张敏, 胡纯, 吴小燕); 434020 荆州, 湖北省荆州市中心医院肾内科(张敏)

【摘要】 目的 糖尿病肾脏病(DKD)是糖尿病的严重并发症,是全球面临的重要公共卫生问题。由于 DKD 发病机制复杂,至今尚缺乏特异有效的治疗措施。细胞外基质(ECM)增多是 DKD 最主要的病理特征。硫酸软骨素/硫酸软骨素蛋白多糖(CS/CSPG)是 ECM 的重要组成部分,包含一大类结构复杂、功能多样的生物活性分子。它们在生理和病理条件下发挥重要的功能和调节作用。现有证据表明,DKD 肾脏中存在 CS/CSPG 重塑,几种 CSPG 在 DKD 发生、发展的关键环节(如炎症、纤维化、脂质代谢)中发挥重要作用,调控 CS/CSPG 可能是防治 DKD 的有效措施,进一步探索 CS/CSPG 在 DKD 中的作用和机制有可能为 DKD 的治疗带来新的突破。

【关键词】 硫酸软骨素;硫酸软骨素蛋白多糖;糖尿病肾病

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.12.013

Research progress of chondroitin sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan in diabetic kidney disease ZHANG Min, HU Chun, WU Xiao-yan. Department of Nephropathy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Diabetic kidney disease (DKD) is a serious complication of diabetes mellitus and an important global public health problem. Due to the complex pathogenesis of DKD, there is still few specific and effective treatment measures. Increased extracellular matrix (ECM) is the most important pathological feature of DKD. Chondroitin sulfate/chondroitin sulfate proteoglycan (CS/CSPG) is an essential component of ECM, including a large family of biological active molecules with complex structures and various functions. They play important functional and regulatory roles in physiology and pathology. Existing evidence has shown that there is CS/CSPG remodeling in DKD, and several CSPGs have significant effect on the pathogenesis and progression of DKD, involving inflammation, fibrosis, and lipid metabolism. Regulation of CS/CSPG might be useful for the prevention and treatment of DKD, and further exploration of CS/CSPG probably bring new breakthroughs in the treatment of DKD.

【Key words】 Chondroitin sulfate; Chondroitin sulfate proteoglycan; Diabetic kidney disease

糖尿病肾脏病(DKD)是糖尿病的严重并发症,已成为全球终末期肾脏病(ESRD)的首要原因,目前也是我国慢性肾衰竭和 ESRD 的第二位病因,且其发病率呈逐渐上升趋势。

DKD 发病机制复杂,涉及代谢紊乱、氧化应激、血管活性物质、炎症、纤维化等多种因素,至今尚缺乏特异、有效的

治疗措施。DKD 最主要的形态学特征是细胞外基质(ECM)增多,表现为基底膜增厚、系膜基质和小管间质扩张,晚期出现肾小球硬化和小管间质纤维化。因此,更好的理解 DKD 中 ECM 聚集的相关机制,将有利于我们更全面的认识 DKD 以及为 DKD 的治疗提供新的措施。

糖胺聚糖(GAG)是 ECM 的重要组成部分,主要包括硫

【基金项目】 湖北省卫生计生科研项目(WJ2019M210);武汉大学中南医院科技创新培育基金(znpy2017044) **【作者简介】** 张敏,女,博士在读,主治医师,研究方向:糖尿病肾病防治,E-mail:zhangmin19860901@126.com **【通信作者】** 吴小燕,女,博士,教授,研究方向:糖尿病肾病防治,E-mail:wuxiaoyan2k6@163.com

乙酰肝素(HS)、硫酸软骨素/硫酸皮肤素(CS/DS)、透明质酸(HA)和硫酸角质素(KS)。除 HA 外,其他 GAG 都被不同程度硫酸化。由于 HS 是肾脏和 GBM 中主要的 GAG 成分,既往对 HS 研究较多,认为肾脏 HS 含量和结构的改变以及 HS 相关酶(如乙酰肝素酶)的水平和活性变化与 DKD 的发生、发展相关^[1]。然而,随着研究不断进展,HS 在 DKD 中的作用逐渐受到质疑。与此同时,其他 GAG 成分(如 CS/DS)引起了一些研究者的关注^[2-3]。

一、CS/CSPG

CS 是由重复的 D-葡聚糖醛酸(GlcA)和 N-乙酰 D-半乳糖胺(GalNAc)二糖单位构成的无分支、硫酸化多糖链。多糖链中部分 D-葡聚糖醛酸差向异构化为 L-艾杜糖醛酸(DoA),则称为皮肤软素(DS)。CS 广泛分布于动物和人体组织 ECM 和细胞表面。它可以多糖链形式单独存在,或经一个四糖链接区与蛋白质核心共价连接,形成硫酸软骨素蛋白多糖(CSPG)。

CS 多糖链的生物合成发生在细胞内质网和高尔基体,主链合成之后,需要在各种酶的作用下进行硫酸化和差向异构化结构修饰。硫酸化可位于二糖单元的 C2、C4 和 C6 位置,产生 6 种不同的二糖单元;CS-O(GlcA-GalNAc)、CS-A(GlcA-GalNAc4S)、CS-B(GlcA2S-GalNAc4S)、CS-C(GlcA-GalNAc6S)、CS-D(GlcA2S-GalNAc6S)和 CS-E(GlcA-GalNAc4S,6S)。因此,尽管 CS 主链结构并不复杂,但由于包含的二糖单元数目可变、硫酸化模式不同以及存在差向异构化,CS 的结构具有高度的不均一性,导致其生物学功能极其复杂多样^[4]。

既往 CS/CSPG 仅仅被认为是细胞外空间填充物,起着结构支持作用。随后,越来越多的证据表明,CS/CSPG 还是细胞及其周围环境重要的生物学信息来源。它们通过与各种生物活性分子(如细胞因子、生长因子、趋化因子、形态发生蛋白、酶及其抑制剂、细胞表面受体以及细胞外其他结构成分)相互作用,调节一系列信号通路,控制包括增殖、分化、迁移、基质合成在内的各种细胞行为,在维持组织稳态、形态发生、发育、生长和疾病等多方面发挥重要功能^[5-6]。

目前,已有不少研究提示,CS/CSPG 在包括 DKD 在内的多种疾病中具有重要的病理生理意义,围绕 CS/CSPG 的干预措施是极具潜力的治疗方法。

二、DKD 肾脏中 CS/CSPG 重塑

肾脏中 CS/CSPG 的表达和分布受到精细调控,具有独特的时间和空间模式。多项研究证实,DKD 肾脏中 CS/CSPG 发生重塑。

正常成人肾脏 CS/CSPG 主要位于肾间质、肾小管、Bowman 囊和血管内皮。胚胎期肾脏中 CS 含量丰富,占总硫酸化 GAG 的 75%,而在成熟肾脏中仅 14%^[7]。研究发现,广泛分布于各种基底膜中的基底膜特异性硫酸软骨素蛋白多糖(BM-CSPG)不存在于正常成人 GBM 中。BM-CSPG 在胚胎期大鼠 GBM 中强烈表达,但出生后 6 周开始逐渐消失。然而,有趣的是,在糖尿病大鼠中,BM-CSPG 重新出现

于 GBM,位于增厚的 GBM 内皮下区域,伴随该部位毛细血管内皮细胞形态异常,表现为窗孔消失、细胞体从 GBM 分离^[8]。另一项研究显示,随着时间推移(2~19 个月),WBN/Kob 自发性糖尿病大鼠 GBM 中 HS 含量逐渐减少,而 CS 从 2 个月到 10 个月间逐渐增加,19 个月时又降至 2 个月水平,表明 CS 在早期糖尿病 GBM 中一过性增多,且与 GBM 的电荷变化趋势一致^[9]。对于 GBM 中 CS 异常表达的具体机制和意义尚不十分明确,推测这可能是 DKD 的早期标志,异常表达的 CS 可能通过影响内皮细胞形态和功能以及 GBM 电荷屏障对肾小球滤过功能产生影响。

有关 DKD 肾脏中 CS 含量改变的数据主要来自于几项动物研究,结果存在差异。Cadaval 等^[10]在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾脏中检测到 CS/DS 含量增加。Joladarashi 等^[11]则发现 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾脏中 CS 减少。Pourghasem 等^[12]应用临界电解质浓度染色法也发现四氧嘧啶诱导的早期糖尿病大鼠肾脏中 CS 含量降低。Reine 等^[3]对糖尿病小鼠的研究则发现,肾脏 CS 含量没有明显改变。上述研究结果不一致,可能与实验设计(如动物模型)和检测方法等因素有关。目前尚无 DKD 患者肾组织中 CS 含量改变的相关报道。

另有动物研究显示,DKD 肾脏中 CS 的结构和功能发生改变。Reine 等^[3]对糖尿病小鼠肾脏 CS 二糖组成进行了分析,结果显示 4-O-硫酸化(CS-A)和 6-O-硫酸化二糖(CS-C)减少,未硫酸化二糖(CS-O)相应增多,免疫组化染色也证实肾组织中 CS-A 减少,qRT-PCR 显示与 CS-A 形成有关的软骨素 4-O 磺基转移酶表达降低。Joladarashi 等^[11]在糖尿病大鼠中也发现了肾脏 CS 的结构改变,主要表现为硫酸化程度降低,尤其是 4,6-O-硫酸化二糖(CS-E)的减少,并伴随多种 CS 合成酶 mRNA 表达降低;进一步对 CS 功能进行研究发现,其与多种 ECM 成分的结合能力发生改变。该项研究首次提供了 DKD 中 CS 结构与功能联系的确凿证据,提示 CS 硫酸化降低可能影响其与各种生物活性分子的相互作用。

还有研究发现,DKD 患者尿液中 CS 的组成和结构也发生类似改变。正常尿液 GAG 主要包括 CS、HS 和低硫酸化硫酸软骨素-蛋白质复合物(LSC-PG)。Lepedda 等^[13]研究显示,1 型和 2 型糖尿病患者尿液中 LSC-PG 水平均升高,其携带的 CS 链硫酸化程度降低。另一项针对 2 型糖尿病患者的研究也显示,尿液 LSC-PG 比例升高,CS 比例降低以及 CS 二糖组成改变,表现为 CS-A 减少和 CS-C 增加,CS-C 与 CS-A 的含量比与白蛋白尿具有相关性^[14]。一项对正常白蛋白尿的 1 型糖尿病患者进行随访研究发现,血糖控制不良者尿液 LSC-PG /CS 的比值明显升高^[15]。结合上述研究,可以推测,尿液 CS 改变可能间接反映了肾脏 CS 重塑,并可能是诊断和评估 DKD 的新型标志物。

鉴于已有大量证据表明,CS 的结构尤其是硫酸化模式是决定其功能的关键因素。例如,有研究发现,CS-A 加剧自身免疫性脑脊髓炎动物中的炎症反应^[16],而 CS-C 使病情缓

解;具有高水平 6-O-硫酸化的 CS 比高水平 4-O-硫酸化者更有效地抑制骨髓巨噬细胞中 NF- κ B 的活化^[17-18]。一些细胞黏附分子、趋化因子更倾向于与 4, 6-O-硫酸化 CS/DS 结合^[19]。因此,有理由推测,肾脏 CS 结构和功能改变可能对 DKD 的发生、发展产生重要影响。然而,目前有关 DKD 人类肾组织中 CS 重塑及其影响和机制的研究尚缺乏,有必要进一步探索。

三、DKD 与几种重要的 CSPG

已有研究表明,DKD 肾脏中几种重要的 CSPG 表达明显上调。核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖是携带 CS/DS 链的小蛋白多糖,在正常成人肾脏中主要表达于肾间质,仅微量存在于系膜基质。然而,在 DKD 患者肾脏中发现,小管间质和肾小球尿极纤维化处核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖的蛋白质核心表达明显增多,伴随 I 型胶原蛋白的沉积,且过表达程度与纤维化程度一致,双糖链蛋白聚糖还表达于动脉硬化血管的内膜。有趣的是,尽管两种 CSPG 的 mRNA 表达在各阶段 DKD 的肾小球和小管间质中均明显增多,但是肾小球中蛋白水平的过表达仅在 DKD 晚期出现,提示 DKD 中肾小球核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖的表达在蛋白质和 mRNA 水平存在分离。该现象的具体原因和机制尚未阐明。研究同时发现,显性 DKD 患者血浆中核心蛋白聚糖水平升高,晚期 DKD 患者血浆和尿液核心蛋白聚糖水平均升高,且尿液中转化生长因子- β (TGF- β)与核心蛋白聚糖共沉淀,提示上述分离现象可能与 CSPG 经循环或尿液排出体外,不保留于肾组织有关^[20]。此外,在糖尿病小鼠肾皮质、高糖培养的系膜细胞和肾小管上皮细胞中也报道了核心蛋白聚糖的过表达^[21]。以上证据均提示,核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖与 DKD 之间有着紧密联系。既往研究已经证实,可溶性核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖在许多以炎症和纤维化为特征的疾病中具有至关重要的作用。由此可以进一步推测,核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖极可能通过调控炎症和纤维化直接参与 DKD 的发生、发展。

1. 核心蛋白聚糖 TGF- β 一直被认为是 DKD 发病机制的中心环节。大量体内外研究均证实,DKD 肾脏中 TGF- β 表达上调是导致 ECM 聚集、肾小球硬化和间质纤维化的关键因素。核心蛋白聚糖因能结合并中和 TGF- β 活性、具有抗纤维化效应,已在纤维化疾病中受到广泛关注^[22]。

研究发现,核心蛋白聚糖基因缺陷可导致糖尿病小鼠的肾病病情恶化,表现为白蛋白尿增多、肾功能进展加速、ECM 蓄积增多、肾小管上皮细胞凋亡明显、单核巨噬细胞浸润增多以及多种促纤维化和促炎分子的表达增加^[23]。通过构建表达核心蛋白聚糖的重组腺病毒,多项体内外研究显示,核心蛋白聚糖过表达可下调肾脏 TGF- β 和 ECM 组分的表达、调控基质金属蛋白酶(MMP)表达、具有抗白蛋白尿和抗肾脏纤维化作用^[24-25]。上述研究为核心蛋白聚糖在 DKD 中的肾脏保护作用提供了有力证据。此外,在肾小球肾炎和阻塞性尿路病等其他肾病动物模型中,也证实了核心蛋白聚糖作为抗纤维化分子的肾脏保护作用^[20]。

核心蛋白聚糖的抗纤维化作用涉及多种机制:(1)核心蛋白聚糖直接或间接抑制 TGF- β 的活性。一方面,核心蛋白聚糖直接结合 TGF- β ,将其以复合物形式隔离在 ECM 内或经尿液排出体外;另一方面,核心蛋白聚糖竞争性结合 TGF- β 受体或通过与胰岛素样生长因子-1(IGF-1)受体结合诱导 TGF- β 的亲合力调节分子 fibrillin-1 的表达,间接抑制 TGF- β 的作用。与其他 TGF- β 抑制剂相比,核心蛋白聚糖还具有一项独特的优势,其仅特异性抑制病理刺激产生的 TGF- β 活性,而对基础 TGF- β 没有影响,提示核心蛋白聚糖具有潜在的药理学应用价值^[26]。(2)核心蛋白聚糖介导的 IGF-1 受体信号级联能抑制足细胞和肾小管上皮细胞凋亡;核心蛋白聚糖与另一种重要的促纤维化因子结缔组织生长因子(CTGF)也具有高度亲和力;它还表皮生长因子受体相互作用,并能诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21WAF1/CIP1,据报道该分子是实验性 DKD 肾小球肥大的关键因子^[22]。(3)另外在基因缺陷小鼠中观察到,核心蛋白聚糖缺乏与低血浆脂联素和糖尿病小鼠的早期死亡有关,导致这一现象的原因尚不明确,推测核心蛋白聚糖可能通过调控脂联素发挥肾脏和心血管保护作用^[27];核心蛋白聚糖缺陷小鼠肾脏 Nox4 表达增加,而 Nox4 是 NADPH 氧化酶异型体,与 DKD 密切相关^[28],提示核心蛋白聚糖在 Nox4 表达的调节方面具有直接作用。

基于以上证据,有理由认为,DKD 中所观察到的核心蛋白聚糖表达上调可能是肾脏对抗纤维化的适应性反应,核心蛋白聚糖在 DKD 中主要作为抗纤维化保护因子而存在,核心蛋白聚糖可能是治疗 DKD 的潜在靶点。

2. 双糖链蛋白聚糖 炎症是促进 DKD 进展的重要因素之一。已有大量证据显示,双糖链蛋白聚糖是肾脏无菌性炎症的有效触发因子。最早发现,在肾小管间质炎症中,双糖链蛋白聚糖在小管中过表达,且该过表达发生于巨噬细胞浸润之前。进一步体内外研究证实,可溶性双糖链蛋白聚糖过表达与炎症表型有关,双糖链蛋白聚糖表达缺陷具有肾脏保护作用。例如,在狼疮肾炎(LN)模型中,双糖链蛋白聚糖过表达引发全身和肾脏病情恶化,导致 TNF- α 和趋化因子(如 CCL2、CCL3、CCL5、CXCL13)水平升高,巨噬细胞和 T、B 淋巴细胞在肾脏募集增多^[29]。在缺血性急性肾损伤小鼠中,可溶性双糖链蛋白聚糖增加血浆和肾脏 TNF- α 、CXCL1、CCL2 和 CCL5 的水平,引起中性粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞浸润以及肾功能恶化^[30]。在单侧输尿管梗阻(UUO)和 LN 模型中,双糖链蛋白聚糖缺陷者受累肾脏中活化 caspase-1 和成熟 IL-1 β 的水平均较低,且肾损伤减轻^[29,31]。近期有研究表明,在 DKD 和 LN 小鼠模型中,可溶性双糖链蛋白聚糖刺激巨噬细胞产生趋化因子 CXCL10 和 CCL20,引诱 Th1 和 Th17 细胞募集至肾脏,进而产生 IFN- γ 和 IL-17,且双糖链蛋白聚糖介导的 Th 细胞募集与白蛋白尿相关。此外,在 DKD 和 LN 患者的血浆中检测到双糖链蛋白聚糖与 CXCL10 水平呈正相关,提示双糖链蛋白聚糖是炎性肾病中 Th1 和 Th17 细胞募集的触发因素^[32]。

目前认为,双糖链蛋白聚糖主要以其可溶形式作为危险相关分子模式(DAMP)通过与 Toll 样受体(TLRs)和炎性小体相互作用,自发地引发肾脏无菌炎症。在应激和损伤等病理条件下,双糖链蛋白聚糖合成分泌增多或从 ECM 中酶解释放,成为可溶性双糖链蛋白聚糖。可溶性双糖链蛋白聚糖与细胞表面受体 TLR2、TLR4 结合,激活 MAPK p38、Erk、NF- κ B 等重要信号转导分子,导致 TNF- α 分泌,并产生一系列 T 细胞、中性粒细胞和巨噬细胞趋化因子,而募集的巨噬细胞又能进一步合成分泌双糖链蛋白聚糖放大促炎效应。此外,双糖链蛋白聚糖还能诱导 NLR 家族 NLRP3 炎症小体的激活,触发 caspase-1 活化,活化的 caspase-1 进而促进 IL-1 β 的成熟^[33]。研究还发现,肾脏中双糖链蛋白聚糖通路活性氧(ROS)通路、SphK1 驱动的 ECM 鞘脂信号通路之间存在相互串扰^[34-35]。

最近的数据表明,除了作为促炎性 DAMP 的常规作用外,双糖链蛋白聚糖还引发抗炎信号途径。这一作用通过选择性使用不同的 TLRs、共受体、衔接分子以及不同信号通路串扰来实现。双糖链蛋白聚糖一方面刺激 TLR2/4、P2X7 受体和 NLRP3 炎症小体,产生和激活促炎性 IL-1 β ,另一方面通过 TLR4/TRIF 和 NOX2,抑制 IL-1 β 的过表达,发挥抗炎作用^[33,36]。

此外,脂代谢紊乱是 DKD 的一种独立损伤因素。高脂血症加速 DKD 恶化,DKD 肾脏中存在脂质沉积。研究显示,高胆固醇饮食的糖尿病小鼠出现 DKD 进展加速,肾脏脂质和双糖链蛋白聚糖含量增加,且二者在肾脏中共定位^[37];另有研究表明,双糖链蛋白聚糖与低密度脂蛋白具有较高的结合力,而 TGF- β 诱导合成的双糖链蛋白聚糖 CS 链过度延长,与脂蛋白的结合力进一步增强^[38]。因此,以上证据提示,双糖链蛋白聚糖可能通过介导肾脏脂质沉积促进 DKD 的进展。然而,也有研究显示,双糖链蛋白聚糖缺乏虽然导致 DKD 减轻,白蛋白尿减少,但对肾脏脂质积累没有影响^[39]。

总之,双糖链蛋白聚糖是肾脏炎症反应中的关键分子,且其作用复杂,可通过不同的配体和信号通路调控肾脏炎症,抑制双糖链蛋白聚糖的促炎信号通路可能是减轻 DKD 肾脏炎症和纤维的有效策略。此外,双糖链蛋白聚糖还可能通过介导肾脏脂质沉积促进 DKD 的进展。

3. CSPG-4(NG2) CSPG-4(NG2)是一种跨膜蛋白多糖,主要表达于未成熟的少突胶质细胞和成软骨细胞祖细胞表面,在脊髓损伤和软骨形成中表达上调,还表达于肿瘤细胞。CSPG-4 具有多种生物学功能,包括维持细胞和周围基质的稳定,参与细胞增殖、迁移,抑制轴突再生中神经元的生长等。它可与 α 4 β 1 整合蛋白和纤连蛋白相互作用,能促进 MMP2 的活化,作为共受体或与细胞质激酶 FAK、Erk1、Erk2 结合参与信号转导,还通过结合成纤维细胞生长因子(FGF)和血小板衍生因子(PDGF)调控细胞增殖和分化,与 V 型和 VI 型胶原蛋白结合促进细胞附着,还可以诱导有助于细胞扩散和迁移的细胞骨架重组^[5]。目前 CSPG-4 在神

经系统、肿瘤等领域的研究较为广泛。然而,也有研究者发现,NG2 与 DKD 有关。NG2 表达于正常大鼠肾小球系膜、Bowman 囊和间质血管,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠中,肾脏 NG2 mRNA 和蛋白质表达均显著增多,进一步体外研究发现,过表达 NG2 的大鼠系膜细胞增殖能力增强、合成 ECM 增多,而靶向敲低 NG2 使其增殖能力下降、ECM 生成减少。该研究结果表明,NG2 可能通过刺激系膜细胞的增殖和 ECM 的合成,促进 DKD 肾小球硬化的发生^[40]。

4. CD44 CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,是人体主要的 HA 受体。CD44 主要参与淋巴细胞归巢、淋巴细胞激活,并与肿瘤细胞侵袭转移有关。已有一些研究提示,CD44 在 DKD 中具有重要作用。对肾病患者肾组织进行检测发现,包括 DKD 在内的多种肾病中,肾小管上皮细胞 CD44 表达明显增加,并与肾脏瘢痕形成相关。在糖尿病大鼠缺血肾损伤模型中也发现,损伤部位的肾小管中 CD44 染色增加,且在相同部位出现的炎性细胞也表达 CD44^[41],提示 CD44 参与肾损伤炎症反应。已有研究表明,CD44 可通过激活蛋白激酶 C(PKC)和 NF- κ B,介导炎症介质表达(如 TNF- α 、IL-6、IL-18、iNOS 和 MMP)在糖尿病组织损伤中发挥关键作用^[42]。近年来,多项研究应用生物信息学方法一致鉴定出 CD44 是 DKD 中的重要基因,是 DKD 中复杂信号网络的关键节点^[43-44]。CD44 参与 DKD 中血管生成的调控,与肾小球壁层上皮细胞活化、Bowman 囊增厚有关^[45]。然而,有关 CD44 在 DKD 中的更多信息尚有待于进一步研究揭示。

四、DKD 肾脏 CS/CSPG 重塑的机制

DKD 肾脏中 CS/CSPG 重塑的机制尚未破译。多项研究提示,参与 DKD 发生、发展的重要细胞因子和生长因子可调控肾细胞中 CS/CSPG 的表达^[7]。例如,TGF- β 参与内皮细胞外 CS 的聚集,促进体外培养的成人系膜细胞 CSPG 合成增多。IL-1 β 引起剂量依赖性 CSPG 合成增多;PDGF 在低剂量下减少 CSPG 的合成,高剂量下刺激其合成;TNF- α 以剂量和时间依赖性上调 CSPG 的表达。TGF- β 可使大鼠系膜细胞核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖的合成分泌明显增加,肾小球上皮细胞中双糖链蛋白聚糖的合成显著增加。此外,有研究显示,高葡萄糖条件导致肾小球系膜细胞和上皮细胞 CSPG 合成减少;高糖、HA、前列腺素 E2(PGE2)导致分离培养的糖尿病大鼠肾小球中 CS 合成分泌减少;氧化应激作为促进 DKD 的重要因素也与组织中 GAG 代谢改变有关,ROS 导致 CS 解聚^[46]。

五、CS/CSPG 在 DKD 中的应用价值

如前所述,核心蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖表达缺陷或过表达的研究提示,CSPG 可能是 DKD 治疗中的潜在靶点。Gomes 等^[47]研究发现,应用岩藻糖基化 CS(FCS,一种从海洋棘皮动物中提取的 CS)治疗 DKD 小鼠,可使白蛋白尿减轻、肾脏 TGF- β 表达减少,系膜基质沉积和小管间质扩张减轻,足细胞损伤和巨噬细胞浸润得到改善,提示 CS 治疗具有肾脏保护作用。尽管现有证据还十分有限,但均高度提示

调控 CS/CSPG 可能是治疗 DKD 的有效措施。因此,有必要对 CS/CSPG 在 DKD 中的作用及机制进行更深入、广泛的研究。

六、CS/CSPG 在其他疾病中的研究进展

近年来,CS/CSPG 在多个领域受到广泛关注。越来越多的证据表明,CS/CSPG 直接参与疾病的发生、发展,而补充外源性 CS 或修饰内在的 CS 有望成为治疗多种疾病的新方法。这也为探索 CS/CSPG 在 DKD 中的作用和机制提供了重要线索和依据。

基于许多临床试验和荟萃分析,外源性 CS 一直被欧洲抗风湿病联盟推荐为治疗骨关节炎的症状性慢作用药物,在美国等国家也被批准为骨关节炎的膳食补充剂。尽管对于其临床疗效尚存在争议,但通过大量体内外研究已经证明,CS 具有强大的免疫炎症调控作用。目前认为,CS 通过抑制 NF- κ B 的活化和核转位,减少炎性细胞因子(如 IL-1 β 、TNF- α)、蛋白水解酶(如 MMP)和炎性酶(如 COX-2、NOS-2)的合成和分泌,发挥抗炎保护作用。CS 还能抑制炎症细胞定向趋化,减弱吞噬能力和溶菌酶的释放以及保护细胞膜免受活性氧物质(ROS)的影响^[48-49]。

大量证据表明,补充外源性 CS 具有心血管保护作用。早在 70 年代就观察到,用商业化 CS-A 治疗的冠心病患者,冠状动脉事件发生率和死亡率明显降低。之后,在 CS 治疗骨关节炎的临床试验中同样发现,用 CS 治疗者冠状动脉事件发生率降低了 7 倍^[50]。有研究者认为,CS 的心血管保护作用可能与其抑制内皮细胞炎症有关。体内研究发现,用 CS 治疗的小鼠动脉粥样硬化病情减轻,血清 IL-1 β 、TNF- α 和趋化因子水平降低。体外研究发现,TNF- α 刺激的冠状动脉内皮细胞和单核细胞在 CS 存在下分泌较少的促炎细胞因子,细胞内 TNF- α 信号通路被抑制,且单核细胞的迁移明显减少^[51]。

最近一项有关心力衰竭和心肌纤维化的研究发现,患者和动物模型心肌组织中存在 CS(主要为 CS-A)病理性积聚,其介导心肌炎症和纤维化的发生。体外研究显示,一方面,各种刺激因子(包括氧化应激、缺氧、TGF- β 、IL-1 β 、TNF- α)可引起相应心肌细胞(如成纤维细胞、冠脉平滑肌细胞、巨噬细胞)中 CS 相关合成酶和 CSPG 蛋白质核心的表达上调,导致 CSPG 合成增多以及新合成的 CS 链结构异常;另一方面,CS-A 与 TNF- α 以高亲和力结合,诱导心肌细胞 VCAM1 和 TNFA 表达上调,而应用重组人芳基硫酸酯酶 B(rhASB,一种主要降解 CS-A 的酶),可以显著改善心力衰竭动物的心功能、减轻心肌炎症和纤维化^[52]。

神经系统领域发现,多种神经系统疾病与 CSPG 表达上调有关,如帕金森症、阿尔茨海默病、年龄相关的神经变性、创伤性脑/脊髓损伤和多发性硬化症等,并且 CSPG 在损伤部位的聚集具有有害后果。既往普遍认为,CSPG 的不利影响主要与其作为屏障阻碍神经突触的再生有关,而最近的研究表明,CSPG 还通过整合来自微环境的信号、激活免疫细胞、激活基质降解酶、增强局部炎症,发挥重要的神经促炎作

用^[53]。几项最新的研究结果显示,应用软骨素酶 ABC(ChABC,一种降解 CS 的细菌酶)可有效降低多种中枢及周围神经系统疾病中损伤部位 CSPG 的聚集,抑制胶质瘢痕形成,减少氧化损伤和炎症反应,促进神经组织再生,改善神经功能^[54-56]。

还有研究显示,补充 CS 和透明质酸可以减轻膀胱疼痛综合征/间质性膀胱炎患者的炎症、疼痛等症状^[57]。仿生支架上固定的 CS 在驱动软骨形成的同时能够调节炎症^[58]。补充外源性 CS 能预防脂多糖诱导的小鼠肝损伤,其机制可能涉及通过 MAPK 信号通路调控氧化应激、炎症和细胞凋亡^[59]。补充 CS 还能通过抑制 NF- κ B 活化,预防小鼠腹膜纤维化^[60]。CS-C 可降低小鼠巨噬细胞中促炎细胞因子(IL-6、TNF- α)的产生,增加 IL-10 的合成,从而干扰其促炎反应^[18]。

综上所述,CS/CSPG 是一大类结构复杂、功能多样的生物活性分子,在生理和病理条件下发挥重要的功能和调节作用。围绕 CS/CSPG 的干预在骨关节、心血管和神经系统等多个领域中已经显现出潜在的应用价值。尽管目前 DKD 中有关 CS/CSPG 的研究不多,其确切作用及机制有待于进一步研究阐明,但现有证据高度提示 CS/CSPG 与 DKD 关系密切。DKD 肾脏中存在 CS/CSPG 重塑,几种 CSPG 在 DKD 发生、发展的关键环节(如纤维化、炎症、脂质代谢)中发挥重要作用,而调控 CS/CSPG 可能是防治 DKD 的有效措施。因此,进一步研究 CS/CSPG 在 DKD 中的作用和机制有可能为 DKD 的治疗带来新的突破。

参 考 文 献

- [1] Goldberg R, Rubinstein AM, Gil N, et al. Role of heparanase-driven inflammatory cascade in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2014, 63(12): 4302-4313.
- [2] Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, et al. The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(1): 26-33.
- [3] Reine TM, Grøndahl F, Jenssen TG, et al. Reduced sulfation of chondroitin sulfate but not heparan sulfate in kidneys of diabetic db/db mice[J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(8): 606-616.
- [4] Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(10): 4719-4733.
- [5] Hayes A, Sugahara K, Farrugia B, et al. Biodiversity of CS-proteoglycan sulphation motifs: chemical messenger recognition modules with roles in information transfer, control of cellular behaviour and tissue morphogenesis[J]. *Biochem J*, 2018, 475(3): 587-620.
- [6] Pudelko A, Wisowski G, Olczyk K, et al. The dual role of the glycosaminoglycan chondroitin-6-sulfate in the development, progression and metastasis of cancer[J]. *FEBS J*, 2019, 286(10): 1815-1837.

- [7] Gowd V, Gurukar A, Chilkunda ND. Glycosaminoglycan remodeling during diabetes and the role of dietary factors in their modulation[J]. *World J Diabetes*, 2016, 7(4): 67-73.
- [8] McCarthy KJ, Abrahamson DR, Bynum KR, et al. Basement membrane-specific chondroitin sulfate proteoglycan is abnormally associated with the glomerular capillary basement membrane of diabetic rats[J]. *J Histochem Cytochem*, 1994, 42(4): 473-484.
- [9] Karasawa R, Nishi S, Suzuki Y, et al. Early increase of chondroitin sulfate glycosaminoglycan in the glomerular basement membrane of rats with diabetic glomerulopathy[J]. *Nephron*, 1997, 76(1): 62-71.
- [10] Cadaval RA, Kohlman O, Michelacci YM. Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus[J]. *Glycobiology*, 2000, 10(2): 185-192.
- [11] Joladarashi D, Salimath PV, Chilkunda ND. Diabetes results in structural alteration of chondroitin sulfate/dermatan sulfate in the rat kidney; effects on the binding to extracellular matrix components[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(7): 960-972.
- [12] Pourghasem M, Nasiri E, Sum S, et al. The assessment of early glycosaminoglycan concentration changes in the kidney of diabetic rats by critical electrolyte concentration staining[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2013, 2(2): 58-63.
- [13] Lepedda AJ, Nieddu G, Rocchiccioli S, et al. Levels of urinary trypsin inhibitor and structure of its chondroitin sulphate moiety in type 1 and type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 9378515.
- [14] Zhao TT, Lu XG, Davies NM, et al. Diabetes results in structural alteration of chondroitin sulfate in the urine[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2013, 16(3): 486-493.
- [15] De Muro P, Fresu P, Tonolo G, et al. A longitudinal evaluation of urinary glycosaminoglycan excretion in normoalbuminuric type 1 diabetic patients[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006, 44(5): 561-567.
- [16] Zhou JH, Nagarkatti P, Zhong Y, et al. Immune modulation by chondroitin sulfate and its degraded disaccharide product in the development of an experimental model of multiple sclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 223(1/2): 55-64.
- [17] da Cunha AL, Aguiar JAK, Correa da Silva FS, et al. Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondrocytes and macrophages? [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103: 1019-1031.
- [18] Tan GK, Tabata Y. Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF- κ B nuclear translocation[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6): 2684-2692.
- [19] Kjellén L, Lindahl U. Specificity of glycosaminoglycan-protein interactions[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, 50: 101-108.
- [20] Nastase MV, Janicova A, Roedig H, et al. Small leucine-rich proteoglycans in renal inflammation: two sides of the coin[J]. *J Histochem Cytochem*, 2018, 66(4): 261-272.
- [21] Barati MT, Gould JC, Salyer SA, et al. Influence of acute high glucose on protein abundance changes in murine glomerular mesangial cells[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 3537863.
- [22] Nastase MV, Iozzo RV, Schaefer L. Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(8): 2460-2470.
- [23] Merline R, Lazaroski S, Babelova A, et al. Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(Suppl 4): 5-13.
- [24] Dong FQ, Li H, Wu F, et al. Effects of overexpression of decorin on matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat mesangial and tubular cells[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(48): 3444-3447.
- [25] Zhang Z, Wu F, Zheng FP, et al. Adenovirus-mediated decorin gene transfection has therapeutic effects in a streptozocin-induced diabetic rat model[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 116(1): e11-e21.
- [26] Bacilieri M, Naggi A, Ceol M, et al. Inhibitory effects of glycosaminoglycans on basal and stimulated transforming growth factor- β 1 expression in mesangial cells: biochemical and structural considerations[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(8): 1029-1037.
- [27] Zha DQ, Wu XY, Gao P. Adiponectin and its receptors in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and clinical potential[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(7): 2022-2034.
- [28] Jha JC, Gray SP, Barit D, et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(6): 1237-1254.
- [29] Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, et al. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(12): 4251-4272.
- [30] Moreth K, Frey H, Hubo M, et al. Biglycan-triggered TLR2- and TLR4-signaling exacerbates the pathophysiology of ischemic acute kidney injury[J]. *Matrix Biol*, 2014, 35: 143-151.
- [31] Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(36): 24035-24048.
- [32] Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Beckmann J, et al. Biglycan, a novel trigger of Th1 and Th17 cell recruitment into the kidney[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68/69: 293-317.
- [33] Roedig H, Nastase MV, Wygrecka M, et al. Breaking down chronic inflammatory diseases: the role of biglycan in promoting a switch between inflammation and autophagy[J]. *FEBS J*, 2019, 286(15): 2965-2979.
- [34] Hsieh LT, Nastase MV, Roedig H, et al. Biglycan- and sphingosine kinase-1 signaling crosstalk regulates the synthesis of macrophage chemoattractants[J]. *Int J Mol Sci*, 2017,

- 18(3): E595.
- [35] Nastase MV, Janicova A, Wygrecka M, et al. Signaling at the crossroads: matrix-derived proteoglycan and reactive oxygen species signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(12): 855-873.
- [36] Hsieh LT, Frey H, Nastase MV, et al. Bimodal role of NADPH oxidases in the regulation of biglycan-triggered IL-1 β synthesis[J]. *Matrix Biol*, 2016, 49: 61-81.
- [37] Thompson J, Wilson P, Brandewie K, et al. Renal accumulation of biglycan and lipid retention accelerates diabetic nephropathy[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1179-1187.
- [38] Rostam MA, Shajimoon A, Kamato D, et al. Flavopiridol inhibits TGF- β -stimulated biglycan synthesis by blocking linker region phosphorylation and nuclear translocation of Smad2[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 365(1): 156-164.
- [39] Wilson PG, Thompson JC, Yoder MH, et al. Prevention of renal apoB retention is protective against diabetic nephropathy: role of TGF- β inhibition[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(12): 2264-2274.
- [40] Xiong J, Wang Y, Zhu ZH, et al. NG2 proteoglycan increases mesangial cell proliferation and extracellular matrix production[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(4): 960-967.
- [41] Melin J, Hellberg O, Funa K, et al. Ischemia-induced renal expression of hyaluronan and CD44 in diabetic rats[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2006, 103(3): e86-e94.
- [42] Campo GM, Avenoso A, Micali A, et al. High-molecular weight hyaluronan reduced renal PKC activation in genetically diabetic mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(11): 1118-1130.
- [43] Geng XD, Wang WW, Feng Z, et al. Identification of key genes and pathways in diabetic nephropathy by bioinformatics analysis[J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(4): 972-984.
- [44] Cui CJ, Cui YB, Fu YY, et al. Microarray analysis reveals gene and microRNA signatures in diabetic kidney disease[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2161-2168.
- [45] Holderied A, Romoli S, Eberhard J, et al. Glomerular parietal epithelial cell activation induces collagen secretion and thickening of Bowman's capsule in diabetes[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(3): 273-282.
- [46] Singh A, Ramnath RD, Foster RR, et al. Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55852.
- [47] Gomes CL, Leão CL, Venturotti C, et al. The protective role of fucosylated chondroitin sulfate, a distinct glycosaminoglycan, in a murine model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106929.
- [48] Sun YJ, Zhang GZ, Liu Q, et al. Chondroitin sulfate from sturgeon bone ameliorates pain of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 95-101.
- [49] Bishnoi M, Jain A, Hurkat P, et al. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis[J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(5): 693-705.
- [50] de Abajo FJ, Gil MJ, García Poza P, et al. Risk of nonfatal acute myocardial infarction associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, non-narcotic analgesics and other drugs used in osteoarthritis: a nested case-control study[J]. *Pharmacoeconom Drug Saf*, 2014, 23(11): 1128-1138.
- [51] Melgar-Lesmes P, Garcia-Polite F, Del-Rey-Puech P, et al. Treatment with chondroitin sulfate to modulate inflammation and atherogenesis in obesity[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 245: 82-87.
- [52] Zhao RR, Ackers-Johnson M, Stenzig J, et al. Targeting chondroitin sulfate glycosaminoglycans to treat cardiac fibrosis in pathological remodeling[J]. *Circulation*, 2018, 137(23): 2497-2513.
- [53] Stephenson EL, Mishra MK, Moussienko D, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans as novel drivers of leucocyte infiltration in multiple sclerosis[J]. *Brain*, 2018, 141(4): 1094-1110.
- [54] Guo WL, Qi ZP, Yu L, et al. Melatonin combined with chondroitin sulfate ABC promotes nerve regeneration after root-avulsion brachial plexus injury[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 328-338.
- [55] Hettiaratchi MH, O'Meara MJ, Teal CJ, et al. Local delivery of stabilized chondroitinase ABC degrades chondroitin sulfate proteoglycans in stroke-injured rat brains[J]. *J Control Release*, 2019, 297: 14-25.
- [56] Warren PM, Steiger SC, Dick TE, et al. Rapid and robust restoration of breathing long after spinal cord injury[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4843.
- [57] Wyndaele JJJ, Riedl C, Taneja R, et al. GAG replenishment therapy for bladder pain syndrome/interstitial cystitis[J]. *NeuroUrol Urodyn*, 2019, 38(2): 535-544.
- [58] Corradetti B, Taraballi F, Minardi S, et al. Chondroitin sulfate immobilized on a biomimetic scaffold modulates inflammation while driving chondrogenesis[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(5): 670-682.
- [59] Song YO, Kim M, Woo M, et al. Chondroitin sulfate-rich extract of skate cartilage attenuates lipopolysaccharide-induced liver damage in mice[J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(6): E178.
- [60] Abe S, Obata Y, Oka S, et al. Chondroitin sulfate prevents peritoneal fibrosis in mice by suppressing NF- κ B activation[J]. *Med Mol Morphol*, 2016, 49(3): 144-153.

(收稿日期:2019-03-25)