

· 综 述 ·

急性马兜铃酸肾损伤慢性化转归机制的研究进展

吴梅菊 余学清 阳 晓

近年来,越来越多的研究显示急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)与慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是紧密相关的两个临床综合征,CKD 是 AKI 发生的易感因素,而 AKI 也是 CKD 进展的危险因素^[1]。肾间质纤维化是 CKD 的主要标志,也被认为是疾病进展的预测因子,成为治疗 CKD 的靶标^[2]。马兜铃酸肾病(aristolochic acid nephropathy, AAN)是一种可导致 AKI 并最终进展为终末期肾脏病(end-stage renal disease, ESRD)的快速进展性肾间质疾病,由摄入含马兜铃酸(aristolochic acid, AA)类成分的中草药(如关木通、广防己、细辛等)或植物引起^[3]。虽然各国各地区采取了措施禁止含 AA 成分的中草药流通及使用,每年仍有许多新发 AAN 病例发展至 ESRD^[4]。一项来自中国 CKD 调查组的横断面问卷调查显示:1.5%的中国成人长期服用含 AA 的中草药,且长期服用与 CKD 的发生独立相关^[5]。因而,探讨其进展机制,对于揭示有效的干预靶点、延缓或阻断 AAN 病程进展具有重要的现实意义。本文就 AA 诱导 AKI 慢性化转归机制的研究进展作一综述。

1 转化生长因子- β 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是导致多种类型肾脏疾病发生纤维化的主要因素。TGF- β 可通过激活经典 Smad 和非经典(非 Smad)信号通路,活化肌成纤维细胞,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量产生并抑制 ECM 降解,最终发生以胶原蛋白沉积等为特征的纤维化。Smad 蛋白在纤维化调节中的作用非常复杂,具有竞争性的促纤维化和抗纤维化作用(包括调节间充质转变)^[6,7]。新近研究发现 TGF- β /Smads 与长链非编码 RNA 之间存在复杂的相互关联^[8]。在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral

obstruction, UUO)和 AAN 小鼠模型研究中发现,虽然条件性敲除了肾脏间质细胞 TGF- β 受体造成 I 型胶原蛋白表达显著降低,但对整体肾脏纤维化并未产生明显影响^[9],提示 TGF- β 的多效性与不同细胞类型密切相关,但尚未明确介导其促纤维化作用的细胞靶标。近年来关于 TGF- β 在 AAN 进展中的机制研究显示,Wnt/ β -catenin 和对应的相关蛋白(yes-associated protein, YAP)/具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)信号通路涉及其中。

1.1 Wnt/ β -catenin Wnt 信号传导是存在于多细胞生物中复杂且高度保守的信号途径,调节细胞生长发育、功能和表型,参与包括肿瘤形成在内的多种疾病的发生^[10,11]。 β -catenin 是经典 Wnt 信号通路中的核心分子,其在胞质中含量的高低直接影响核内靶基因的表达。在细胞缺乏 Wnt 蛋白时,胞质中游离的 β -catenin 结合在由 Axin、APC、CK1、GSK3 β 形成的胞质复合物上,CK1 和 GSK3 β 相继磷酸化 β -catenin,继而其被 β -Trcp 所识别而泛素化并被蛋白酶体的降解,使得细胞内的 β -catenin 水平降低,核内可与之结合的转录因子处于抑制状态,最终导致靶基因不表达。而当细胞外存在 Wnt 信号时,Wnt 蛋白与受体 Fzd 结合,使得 LRP 被 GSK3 β 和其他激酶磷酸化,然后 Axin 与 LRP 结合,导致由支架蛋白 Axin 介导形成的胞质复合物解离,从而避免 β -catenin 被磷酸化和降解,而游离的 β -catenin 富集在胞质中,随着进一步转位迁移至核内,与相应的转录因子结合,从而激活靶基因的转录^[12]。研究发现 Wnt/ β -catenin 参与 AAN 的慢性化转归。在 AA 诱导的 HK-2 细胞中观察到了 β -catenin 信号通路的激活^[13];AAN 小鼠模型 RNA 测序发现:选择性敲除近端肾小管细胞中的 TGF- β 受体调节了许多生长因子途径,但 Wnt/ β -catenin 信号传导受影响最大;恢复敲除 TGF- β 受体近端肾小管中 β -catenin 活性显著改善了小鼠对肾小管的损伤反应^[14]。体外研究发现白藜芦醇可以抑制 AA 诱导的 HK-2 细胞中 β -catenin 蛋白胞质向核转位现象,从而延缓肾脏的纤维化的进展^[15]。

1.2 YAP/TAZ-Hippo 信号通路 Hippo 信号通

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81570614, No. 81774069)

作者单位:中山大学附属第一医院肾内科(广州 510080)

通讯作者:阳 晓, Tel: 020-87755766 转 8843, E-mail: yangx-sysu@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190729.025

路对于控制器官大小和组织稳态非常重要且在调节细胞增殖、凋亡和分化等方面发挥着重要作用。激活的 Hippo 信号通过抑制 TAZ 和 YAP 维持细胞极性和器官大小。YAP/TAZ 作为 Hippo 信号通路最重要的效应器,其活性取决于它们在细胞中的定位:核蛋白是有活性的,胞质蛋白则无活性^[16]。最近,YAP/TAZ 的定位被认为是通过调节细胞骨架张力的 ECM 僵硬来调节的。健康软组织的 YAP/TAZ 定位于细胞质,受损变硬的组织则发现 YAP/TAZ 位于细胞核。也有研究发现,YAP/TAZ 通过持续激活细胞核 Smad2/3 促进 TGF- β 信号的产生^[17]。最近,研究者在 AAN 小鼠肾间质中发现了 TAZ 核蛋白的积聚。过表达 HK-2 中的 TAZ 可促进结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、波形蛋白和 p21 表达。利用特异性 SMAD3 抑制剂处理稳定过表达 TAZ 的上皮细胞,磷酸化 SMAD3 表达下降,CTGF、FN 等也显著下调。表明 TAZ 参与的纤维化需要 SMAD3 的参与。因而提示 YAP/TAZ 是肾脏损伤后参与调节肾脏纤维化发展的信号通路,其调节 TGF- β 诱导的成纤维细胞 Smad 信号传导,也被认为是治疗肾脏纤维化的新靶点^[18]。

2 巨噬细胞与巨噬细胞过度聚集 巨噬细胞是高度异质的细胞,由于它们所处的微环境和疾病类型差异而表现出不同的表型和功能特征。巨噬细胞分布在正常和患病的肾组织中,被认为是肾纤维化的关键因素。巨噬细胞可表现出抗炎作用促进炎症的消退,或者通过激活肌成纤维细胞导致进一步的组织破坏来促纤维化。一般认为,当肾脏损伤发生时,这些巨噬细胞短时间进入肾小球或间质区域,以调节免疫应答和(或)清理由于原发性肾脏损伤而产生的碎片和凋亡细胞。然而,在持续损伤的情况下,巨噬细胞浸润可导致各种促进损伤愈合的生长因子不断产生,最终引起不可逆的纤维化、组织破坏和进行性 CKD^[19]。最近的研究证实巨噬细胞在多种小鼠肾病模型中活化,促进肾纤维化,并且大多数间质和肾小球病变以巨噬细胞积聚为特征^[20]。一项研究比较了 AAI 急性和慢性肾损伤模型与单侧缺血再灌注损伤、顺铂以及叶酸诱导的肾损伤,发现巨噬细胞在 AAI 诱导的肾病发病机制中起重要作用。AAI 处理的小鼠第 30 天可见肾脏中存在大量巨噬细胞,并且这些巨噬细胞表现出更多的抗炎样巨噬细胞表型,如 IRF4 基因表达增加。用 AAI 培养巨噬细胞 6 天,流式细胞术证实慢性 AAI 处理导致巨噬细胞表面标志物 F4/80 和替代巨噬细胞标志物 CD206 以及活化标志物 CD80 的表达显著增加,

提示 AAN 的肾脏纤维化与巨噬细胞过度积聚和活化的巨噬细胞表型相关^[21]。此外,有研究者在体外培养的肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cells, RTECs)中发现 AA 促进 ECM 产生并增加巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitor, MIF)表达,以及巨噬细胞相关因子的释放;用拮抗剂 ISO-1 抑制 MIF 导致 AA 处理的 TEC 中 MIF 及 TGF- β_1 、COL-III 表达下调^[22]。综上,提示巨噬细胞表型和功能变化是纤维化瘢痕形成或损伤消退的关键决定因素。

此外,免疫系统其他细胞类型也在 AAN 发病机制中发挥重要作用。1994 年,Depierreux M 等^[23]报道了 AAN 患者活检组织中存在淋巴细胞浸润。其后 Pozdzik AA 等^[24]在 AAN 患者以及 AAN 大鼠模型中证实了这一现象:在肾间质中观察到活化的单核细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞流。一项研究以 NSG 小鼠建立 AAN 模型,可见 CD45⁺细胞浸润。利用人肝干细胞来源的细胞外囊泡(human liver stem cell-derived extracellular vesicles, HLSC-EV)处理的 AA 小鼠具有较低的 CD45⁺单核细胞计数,且 HLSC-EV 可以减轻 AA 诱导的肾脏纤维化^[25]。AA 诱导下 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞缺失的小鼠较正常小鼠表现出更严重的急性损伤并且肾脏的促炎细胞因子(MIP-1a、MCP-1)mRNA 水平上调,提示 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞在 AAN 中的保护作用^[26]。针对免疫炎症反应所进行治疗可能在一定程度上改善 AA 导致的肾脏纤维化。

3 细胞周期 G2/M 停滞 研究发现 AKI 发生后的修复不良是导致 CKD 发生的重要原因^[27]。体内研究发现细胞周期 G2/M 持续停滞可能是参与肾脏急性肾损伤后发生不良修复的重要机制。细胞 DNA 损伤后,启动细胞周期 G2/M 期 DNA 损伤检测点,导致 G2/M 期短暂停滞,对损伤 DNA 进行修复。如果损伤未能修复,则可引起细胞 G2/M 期持续停滞,产生促纤维化因子 CTGF、TGF- β 等,导致纤维化发生^[27,28]。共济失调症突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM)和共济失调症 Rad3 相关蛋白(ataxia telangiectasia and Rad3 related, ATR)是细胞对 DNA 损伤反应的调节蛋白,通过激活下游的效应靶蛋白-细胞周期检测点激酶 1/2(checkpoint kinase 1/2, CHK1/CHK2),调控细胞周期过程,其中 ATR 磷酸化 CHK1,而 ATM 则磷酸化 CHK2。两者均可使细胞分裂周期蛋白 CDC25 家族磷酸化失活,导致 M 期 CyclinB-CDK1 不能活化,使细胞周期停滞于 G2/M 期^[29,30]。研究在 AA 诱导的小鼠肾脏损伤模型中发

现 RTECs G2/M 停滞比例显著增加;利用 ATM 特异性抑制剂 KU55933 处理 AA 损伤的 HK-2 细胞后,与未经 KU55933 处理的细胞对比发现,G2/M 停滞现象显著下调,同时纤维化相关指标(TGFB1、CTGF、COL4A1 和 COL1A1)的 mRNA 水平表达下调^[31]。因而,G2/M 停滞与肾脏损伤后的纤维化发生显著相关。G2/M 停滞的调控已成为预防和治疗肾脏纤维化的重要靶标。近来研究提出上皮细胞间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)参与 G2/M 停滞的调控^[32]。研究发现,mTORC1 参与 DNA 损伤后的 G2/M 检测点修复,该研究结合功能蛋白质组学、数学建模和分子生物学来发现 mTORC1 是作为 G2/M 检查点修复的决定因素,但 mTOR 缺陷细胞并不影响 G2/M 的 CHK2 和 CHK1 信号激活,而是通过 KDM4B 介导的 CCNB1 和 PLK1 转录调节延迟 DNA 损伤后的有丝分裂进程^[33]。笔者研究探讨了自噬在 AA 诱导的体外培养大鼠肾小管上皮细胞(NRK52E)损伤中的作用和可能机制,结果发现,AA 抑制自噬显著增加 AA 诱导的细胞凋亡,AA 持续刺激诱导过量自噬,增加细胞非凋亡性死亡和细胞再生障碍,抑制自噬可减少细胞死亡^[34],提示 AA 诱导 RTECs 早期发生自噬,并通过抗凋亡效应在早期细胞损伤中发挥保护作用。也有研究发现 Atg5 介导的 RTECs 自噬通过抑制细胞周期 G2/M 停滞,减缓肾间质纤维化的进程^[35]。当细胞自噬过程受到抑制,可促进蛋白酶体途径对 CHK1 的降解,从而使 ATR-CHK1 依赖的 DNA 损伤无误差修复同源重组途径受损,细胞基因组的完整性下降^[36]。体外实验表明抑制 ATM-p53 通路可防止 CHKs 活化,G2/M 停滞减少,从而使 AA 诱导的促纤维化因子释放减少^[37]。以往的研究提示自噬可能通过调控 G2/M 期停滞在 AA 诱导的 AAN 慢性化进展中的发挥作用。

4 结语 关于 AA 导致的 AKI 最终进展至 CKD 的具体机制备受学者关注。研究发现 AAN 发生肾脏纤维化的主要特征为直接肾小管毒性以及抑制增殖作用、生长因子产生减少和早期发生纤维化^[38]。不论是 TGF- β 的致纤维化作用还是巨噬细胞参与的免疫调节,抑或是细胞周期 G2/M 期停滞在肾脏纤维化进展中发挥的作用,参与急性 AAN 慢性化转归的机制复杂且多样。利用良好的动物模型,在阐明相关分子机制的基础上,进一步制定治疗策略,通过不同环节进行靶向阻断。针对这一过程进行深入研究,有助于揭示参与 AAN 发生发展的机制,可能为研发特异性阻断肾脏疾病进展的药物提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Chawla LS, Eggers PW, Star RA, et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes[J]. N Engl J Med, 2014, 371(1): 58-66.
- [2] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, et al. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252.
- [3] Yang B, Xie Y, Guo M, et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13(10): 1605-1611.
- [4] Luciano RL, Perazella MA. Aristolochic acid nephropathy: epidemiology, clinical presentation, and treatment[J]. Drug Saf, 2015, 38(1): 55-64.
- [5] Zhang J, Zhang L, Wang W, et al. Association between aristolochic acid and CKD: a cross-sectional survey in China[J]. Am J Kidney Dis, 2013, 61(6): 918-922.
- [6] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.
- [7] Isaka Y. Targeting TGF- β signaling in kidney fibrosis[J]. Intern J Mol Sci, 2018, 19(9): E2532.
- [8] Zhou Q, Chung AC, Huang XR, et al. Identification of novel long noncoding RNAs associated with TGF- β /Smad3-mediated renal inflammation and fibrosis by RNA sequencing[J]. Am J Pathol, 2014, 184(2): 409-417.
- [9] Neelisetty S, Alford C, Reynolds K, et al. Renal fibrosis is not reduced by blocking transforming growth factor- β signaling in matrix-producing interstitial cells[J]. Kidney Int, 2015, 88(3): 503-514.
- [10] Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
- [11] Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [12] Chae WJ, Bothwell ALM. Canonical and non-canonical Wnt signaling in immune cells[J]. Trends Immunol, 2018, 39(10): 830-847.
- [13] Li J, Zhang M, Mao Y, et al. The potential role of aquaporin 1 on aristolochic acid I induced epithelial mesenchymal transition on HK-2 cells[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(6): 4919-4925.
- [14] Nlandu-Khodo S, Neelisetty S, Phillips M, et al. Blocking TGF- β and beta-Catenin epithelial crosstalk exacerbates CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(12): 3490-3503.

- [15] Xiao Z, Chen C, Meng T, et al. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor-beta pathway on matrix metalloproteinase 7 [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2016, 241(2): 140–146.
- [16] Plouffe SW, Hong AW, Guan K. Disease implications of the Hippo/YAP pathway [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(4): 212–222.
- [17] Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, et al. YAP/TAZ Are mechanoregulators of TGF-beta-Smad signaling and renal fibrogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(10): 3117–3128.
- [18] Anorga S, Overstreet JM, Falke LL, et al. Dereglulation of Hippo-TAZ pathway during renal injury confers a fibrotic maladaptive phenotype [J]. *FASEB J*, 2018, 32(5): 2644–2657.
- [19] Cao Q, Wang Y, Harris DC. Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis [J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2014, 4(1): 16–19.
- [20] Huen SC, Cantley LG. Macrophages in renal injury and repair [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 449–469.
- [21] Honarpisheh M, Foresto-Neto O, Steiger S, et al. Aristolochic acid I determine the phenotype and activation of macrophages in acute and chronic kidney disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12169.
- [22] Lu H, Bai Y, Wu L, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor protects against inflammation and matrix deposition in kidney tissues after injury [J]. *Mediators Inflamm*, 2016: 2174682.
- [23] Depierreux M, Van Damme B, Vanden HK, et al. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs [J]. *Am J Kidney Dis*, 1994, 24(2): 172–180.
- [24] Pozdzik AA, Salmon IJ, Husson CP, et al. Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(8): 2480–2491.
- [25] Kholia S, Herrera Sanchez MB, Cedrino M, et al. Human liver stem cell-derived extracellular vesicles prevent aristolochic acid-induced kidney fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1639.
- [26] Baudoux T, Husson C, De Prez E, et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cells exert regulatory properties during experimental acute aristolochic acid nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5334.
- [27] Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(5): 264–276.
- [28] Canaud G, Bonventre JV. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(4): 575–583.
- [29] Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 149: 124–138.
- [30] Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2006, 7(3): 165–172.
- [31] Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury [J]. *Nat Med*, 2010, 16(5): 527–535.
- [32] Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998–1009.
- [33] Hsieh H, Zhang W, Lin S, et al. Systems biology approach reveals a link between mTORC1 and G2/M DNA damage checkpoint recovery [J]. *Nature Commun*, 2018, 9(1): 3982.
- [34] Zeng Y, Yang X, Wang J, et al. Aristolochic acid I induced autophagy extenuates cell apoptosis via ERK 1/2 pathway in renal tubular epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30312.
- [35] Li H, Peng X, Wang Y, et al. Atg5-mediated autophagy deficiency in proximal tubules promotes cell cycle G2/M arrest and renal fibrosis [J]. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1472–1486.
- [36] Liou JS, Wu YC, Yen WY, et al. Inhibition of autophagy enhances DNA damage-induced apoptosis by disrupting CHK1-dependent S phase arrest [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 278(3): 249–258.
- [37] Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, et al. Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(1): 47–56.
- [38] 费菲. 马兜铃酸肾损害: 从科学问题到临床意义的多轮审视——北京大学肾脏疾病研究所副所长杨莉谈马兜铃酸肾病的机制研究和临床诊疗策略 [J]. *中国医药科学*, 2018, 8(24): 1–3.

(收稿: 2019-01-06 在线: 2019-09-14)

责任编辑: 赵芳芳