

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.004134

IEX-1 通过介导内皮细胞损伤促进糖尿病肾病肾纤维化的作用及机制研究

李 贵¹, 何俊伶², 陈客宏², 毛 敏¹, 左 中¹

(1.重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016; 2.陆军军医大学大坪医院肾内科, 重庆 400042)

【摘要】目的:明确即刻早期反应基因 1(immediate early response gene 1, IEX-1)在糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)中内皮细胞损伤及肾纤维化的关系,并探讨其调控作用。**方法:**采用高脂饮食联合链脲佐菌素(high-fat diet combined with streptozotocin, HFD+STZ)建立 DKD 小鼠模型,检测血糖、肾功能、肾组织病理改变及纤维化相关蛋白表达。通过免疫荧光、免疫组化及实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 IEX-1、内皮损伤相关分子及纤维化标志物的表达。利用 IEX-1 全身敲除小鼠评估其对 DKD 肾损伤及肾纤维化的影响。体外采用高糖联合棕榈酸(high glucose and palmitic acid, HGPA)刺激人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)构建损伤模型,通过小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默 IEX-1 后观察内皮损伤及促纤维化相关分子变化。**结果:**免疫组化显示,DKD 患者肾组织中 IEX-1 表达较 Control 组明显升高($P=0.002$)。免疫荧光结果显示, IEX-1 与血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)在肾组织中呈共定位表达,且 DKD 状态下 IEX-1 表达增强、CD31 表达降低。进一步研究发现,与 DKD 组相比, IEX-1^{-/-}-DKD 组肾组织中纤维化相关标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)表达均明显下调($P<0.01$)。体外实验显示, HGPA 刺激后 HUVECs 中 IEX-1 ($P<0.01$)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1) ($P<0.05$)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) ($P<0.01$)信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)表达明显上调,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) mRNA 表达明显下调($P<0.01$);沉默 IEX-1 后, α -SMA ($P<0.001$)和 COL I mRNA 表达较 HGPA 组明显下降($P<0.05$)。**结论:** IEX-1 在 DKD 肾组织中高表达,可能通过介导内皮细胞损伤相关反应促进肾纤维化,提示其可作为 DKD 潜在的干预靶点。

【关键词】即刻早期反应基因 1;内皮细胞损伤;肾纤维化;糖尿病肾病

【中图分类号】R587.2

【文献标志码】A

Role and mechanism of immediate early response gene 1 in promoting renal fibrosis in diabetic kidney disease by mediating endothelial cell injury

Li Gui¹, He Junling², Chen Kehong², Mao Min¹, Zuo Zhong¹

(1.Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2.Department of Nephrology, Daping Hospital, Army Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the association of immediate early response gene 1 (IEX-1) with endothelial cell injury and renal fibrosis in diabetic kidney disease (DKD), as well as the regulatory role of IEX-1. **Methods:** High-fat diet combined with streptozotocin was used to establish a mouse model of DKD, and related indicators were measured, including blood glucose, renal function, renal histopathological changes, and the expression of fibrosis-related proteins in renal tissue. Immunofluorescence assay, immunohistochemistry, and qRT-PCR were used to measure the expression levels of IEX-1, endothelial injury-related molecules, and fibrosis markers. Mice with IEX-1 global knockout were used to evaluate the effect of IEX-1 deficiency on renal injury and fibrosis in DKD. In the *in vitro* experiment, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were stimulated with high glucose and palmitic acid (HGPA) to establish a model of cell injury. Small interfering RNA-mediated silencing of IEX-1 was performed to observe the changes in endothelial injury and pro-fibrotic molecules. **Results:** Immunohistochemistry showed that compared with the control group, the patients with DKD had a significantly higher expression level of IEX-1 in renal tissue ($P=0.002$). Immunofluorescence assay showed that IEX-1 was co-

localized with CD31 in renal tissue, with an increase in IEX-1 and a reduction in CD31 under the condition of DKD. Further analysis showed that compared with the DKD group, the IEX-1^{-/-}-DKD group had significant reductions in the expression levels of the fibrosis markers α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type

作者介绍: 李 贵, Email: ligui18881736187@163.com,

研究方向: 糖尿病肾病发病机制。

通信作者: 左 中, Email: 202115@cqmu.edu.cn。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260615.1039.002>

(2026-06-15)

I (COL I) in renal tissue ($P < 0.01$). *In vitro* experiments showed that after HGPA stimulation, there were significant increases in the mRNA expression levels of IEX-1 ($P < 0.01$), endothelin-1 ($P < 0.05$), and vascular cell adhesion molecule-1 ($P < 0.01$) and a significant reduction in the mRNA expression level of endothelial nitric oxide synthase ($P < 0.01$) in HUVECs, and after IEX-1 silencing, there were significant reductions in the mRNA expression levels of α -SMA ($P < 0.001$) and COL I ($P < 0.05$) compared with the HGPA group. **Conclusion:** IEX-1 is highly expressed in the renal tissue of DKD and may promote renal fibrosis by mediating endothelial cell injury-related responses, suggesting that it may be used as a potential therapeutic target for DKD.

[Key words] immediate early response gene 1; endothelial cell injury; renal fibrosis; diabetic kidney disease

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见且最严重的微血管并发症之一,也是终末期肾病的主要病因^[1-4]。其病理特征表现为肾小球基底膜增厚、系膜基质扩张、肾小管间质纤维化及进行性肾功能下降^[5-7]。尽管血糖控制、血压管理及肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂等治疗手段在一定程度上延缓了疾病进展^[8],但仍难以有效阻止肾脏结构性损伤及纤维化的发生发展,提示DKD的发病机制尚未完全阐明。

内皮细胞功能障碍被认为是DKD发生发展的关键早期事件^[9-12]。长期高糖及脂毒性状态可诱导肾脏内皮细胞损伤,表现为内皮屏障功能破坏、炎症反应增强及细胞衰老或凋亡,从而促进肾脏微循环障碍和肾间质纤维化进程^[13-16]。因此,阐明调控内皮细胞损伤的关键分子机制,对深入理解DKD的病理基础及寻找新的干预靶点具有重要意义。

即刻早期反应基因1(immediate early response gene 1, IEX-1)是一种应激诱导型基因,参与调控细胞增殖、凋亡、氧化应激及炎症反应^[17-20]。既往研究表明,IEX-1在心血管疾病、代谢紊乱及炎症相关疾病中发挥重要调控作用,尤其与内皮细胞功能稳态密切相关^[21-23]。然而,IEX-1在DKD中是否参与内皮细胞损伤及其在肾纤维化进展中的作用,目前尚缺乏系统研究。

基于此,本研究通过体内及体外实验,分析IEX-1在DKD中与内皮细胞损伤及肾纤维化的关系,并评估其对促纤维化反应的可能调控作用,以期阐明DKD内皮损伤机制及寻找潜在干预靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, S0130, 美国);高脂饲料(high-fat diet, HFD, D12492, 美国);枸橼酸缓冲液

(C0759, 美国);人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs, PCS-100-010);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 10099-141, Gibco, 美国);细胞培养基(Gibco, 美国);小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)及转染试剂;核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂(离心柱);反转录试剂盒;实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测试剂盒;内皮细胞损伤相关基因及纤维化相关基因特异性引物;免疫荧光染色和免疫组织化学所需一抗、二抗及相关试剂。生物安全柜;二氧化碳(carbon dioxide, CO₂)细胞培养箱;倒置显微镜;荧光显微镜;高速冷冻离心机;实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪;超低温冰箱;石蜡包埋机;组织切片机;恒温水浴箱。

1.2 实验方法

1.2.1 人肾组织样本收集与伦理

本研究纳入DKD患者肾穿刺活检组织5例及Control组肾组织5例。DKD患者肾组织取自陆军军医大学大坪医院肾内科肾穿刺活检标本,Control组肾组织取自因肾肿瘤行肾切除术患者的癌旁正常组织(距肿瘤边缘>5 cm)。所有患者均签署知情同意书,研究获医院伦理委员会批准(批号:医研伦审[2022]113号)。

1.2.2 动物实验

1.2.2.1 实验动物与分组 选用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性C57BL/6J小鼠(6周龄)及IEX-1全身性敲除(IEX-1^{-/-})小鼠。IEX-1^{-/-}小鼠由重庆市卫生健康委肾脏病精准诊治重点实验室赠送,最初在C57BL/6J遗传背景上构建,随后与野生型C57BL/6J小鼠(购自重庆医科大学实验动物中心)连续10代以上回交,以确保遗传背景一致。所有实验均使用同窝对照小鼠:通过杂合子(IEX-1^{+/-})互交繁殖获得野生型(wild type, WT)和纯合子(IEX-1^{-/-})同窝小鼠用于实验。基因型通过PCR检测,PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。小鼠在重庆医科大学实验动物中心SPF级屏障系统中繁殖与饲养,环境条件为恒温(22±2)℃、恒湿(50±10)%、12 h光照/黑暗循环,自由摄食和饮水。所有动物实验均遵循实验动物伦理规范,并经重庆医科大学实验动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准(伦理编号:IACUC-CQMU-2026-01051)。小鼠随机分为以下4组:Control组、

DKD 组、IEX-1^{-/-}组和 IEX-1^{-/-}-DKD 组。血糖、24 h 尿蛋白、血清肌酐及尿素氮等建模和肾功能相关指标检测中,每组纳入 5 只小鼠进行分析,即 $n=5$ /组。涉及 IEX-1 基因敲除鼠的肾组织免疫组化及半定量分析中,每组纳入 3 只小鼠进行检测,即 $n=3$ /组;每只小鼠随机选取 3 个视野,计算阳性面积百分比后取平均值。

1.2.2.2 糖尿病肾病模型的建立 糖尿病模型采用高脂饮食联合链脲佐菌素 (high-fat diet combined with streptozotocin, HFD+STZ) 建立。DKD 组和 IEX-1^{-/-}-DKD 组小鼠先给予 HFD 喂养 4 周后,连续 5 d 腹腔注射 STZ (溶于枸橼酸缓冲液, 50 mg/kg)。Control 组和 IEX-1^{-/-}组给予普通饲料并腹腔注射等体积枸橼酸缓冲液。造模后继续给予 HFD 喂养,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的小鼠判定为糖尿病模型成功并分别纳入 DKD 组和 IEX-1^{-/-}-DKD 组。

1.2.2.3 尿蛋白及肾功能指标检测 实验结束前收集小鼠 24 h 尿液,使用全自动生化分析仪测定尿蛋白定量。处死小鼠后采集血液并分离血清,检测血清肌酐、尿素氮等肾功能相关指标,以评估肾功能损伤。

1.2.2.4 肾组织取材及组织学分析 实验结束后,采用肝素钠生理盐水对小鼠进行心脏灌注,充分排尽血液后处死小鼠,迅速摘取双侧肾脏。一侧肾组织固定于 4% 多聚甲醛中,石蜡包埋后用于免疫荧光染色和免疫组织化学分析;另一侧肾组织置于液氮中速冻, -80 °C 保存,用于后续 RNA 提取及实时定量 PCR 分析。

1.2.2.5 组织免疫组化染色 小鼠肾组织石蜡切片 (厚度 2 μ m) 于 60 °C 烤片 2 h 后,依次脱蜡和梯度乙醇复水。随后采用高压热修复法抗原修复,水洗后滴加 3% 过氧化氢溶液,于 37 °C 湿盒中孵育 20 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。水洗后,分别滴加纤维化相关标志物的一抗: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA, BM0002, 博士德) 和 I 型胶原 (collagen type I, COL I, ab90395, Abcam), 置于湿盒中 4 °C 孵育过夜。次日室温复温后,滴加辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的抗小鼠/兔二抗,于 37 °C 湿盒中孵育 40 min。随后滴加 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色液 (B 液:C 液=100:1), 显微镜下观察至组织呈棕黄色后立即以清水终止反应。切片经苏木素复染 5 min,水洗后采用盐酸乙醇快速分化,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后树脂封片,光学显微镜下观察肾组织的病理学改变。免疫组化结果采用半定量分析方法评估,每个样本随机选取 3 个视野,计算阳性面积百分比并取平均值。

1.2.2.6 组织免疫荧光染色 小鼠肾组织石蜡切片 (厚度 2 μ m) 于 60 °C 烤片 2 h 后,依次脱蜡和梯度乙醇复水。随后采用高压热修复法抗原修复,水洗后滴加 3% 过氧化氢溶液,于 37 °C 湿盒中孵育 20 min 以阻断内源性过氧化物酶活性,再用山羊血清封闭 1 h。随后加入相关一抗,分化簇 31 (cluster of differentiation 31, CD31, ab9498) 和 IEX-1

(ab65152, Abcam), 4 °C 孵育过夜。次日加入荧光标记二抗,避光孵育 1 h, 4',6'-二脒基-2-苯基吡啶 (4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核 10 min。染色完成后,于荧光显微镜下观察并采集图像,用于后续分析。

1.2.3 细胞实验

1.2.3.1 细胞培养与处理 HUVECs 购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。细胞培养于内皮细胞专用培养基中,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养。实验采用对数生长期细胞,当细胞融合度达 70%~80% 时进行处理。为模拟糖尿病相关内皮损伤环境,对 HUVECs 给予高糖联合棕榈酸 (high glucose and palmitic acid, HGPA) 处理; Control 组给予等渗葡萄糖处理。处理时间为 48 h。实验独立重复 3 次。

1.2.3.2 IEX-1 基因沉默 采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术沉默 HUVECs 中 IEX-1 的表达。按照转染试剂说明书,将靶向 IEX-1 的小干扰核糖核酸 (small interfering RNA targeting immediate early response gene 1, si_IEX-1) 或阴性对照 siRNA (negative control siRNA, si_NC) 与转染试剂混合后加入细胞中,转染 6 h 后更换新鲜完全培养基。转染 48 h 后进行后续实验。IEX-1 沉默效率采用 qRT-PCR 验证。实验均独立重复 3 次。

1.2.3.3 qRT-PCR 采用 qRT-PCR 检测各处理组 HUVECs 中纤维化相关基因信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 表达水平,所用引物为人源特异性引物 (α -SMA、collagen type I)。同时检测 IEX-1、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 及血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等分子的 mRNA 表达水平。引物采用 Primer Premier 5 软件设计,并经 Oligo 软件验证评估: α -SMA (Forward: AGCCAAGCACTGTCAGGAAT; Reverse: TTGTCACACACCAAGGCAGT); COL I (Forward: TTCTCCTGGCAAAGACGGAC; Reverse: CGGCCACCATCTTGAGACTT); IEX-1 (Forward: CATGTCGAGGAACCGAACCC; Reverse: GATCTGGCAGAAGACCATGGT); ET-1 (Forward: TAGCCAAAAAGACAAGAAGTGC; Reverse: TTCTTCTCTCTACTAAGTCTG); eNOS (Forward: GACCCACTGGTGTCTCTTG; Reverse: CCCGAACACACAGAACCTGA); VCAM-1 (Forward: AGTGGTGGCCTCTGAATGG; Reverse: TGTGTCTCTCTCTCCGCT)。采用离心柱法提取核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA), 2 μ g 总 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA), GoTaq qPCR Master Mix (A6001) 试剂盒说明书按照 20 μ L 体系加样,扩增条件为 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 使用 PCR 仪 (Bio-Rad CFX Connect) 进行荧光定量检测,采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行数据分析。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.5.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组比较采用 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。体外实验数据为 3 次独立实验的汇总分析结果。

2 结果

2.1 糖尿病肾病患者肾组织中 IEX-1 表达明显升高

5 例 DKD 患者及 5 例 Control 组肾组织样本的免疫组化结果显示,DKD 患者肾组织中 IEX-1 表达升高,差异有统计学意义($t=7.320, P=0.002$),提示 IEX-1 可能在 DKD 进展中发挥作用。见图 1。

2.2 IEX-1 在 DKD 小鼠肾组织中的表达特征及内皮细胞定位

采用 HFD+STZ 方法成功建立糖尿病小鼠模型。与 Control 组相比,DKD 组空腹血糖水平升高(≥ 16.700 mmol/L),差异有统计学意义($t=39.070, P<0.001$),提示糖尿病模型建立成

功。进一步检测发现,DKD 组 24 h 尿蛋白排泄量较 Control 组明显增加($t=33.580, P<0.001$)。与 Control 组相比血清肌酐($t=8.645, P<0.001$)和尿素氮($t=16.070, P<0.001$)水平均升高,提示糖尿病状态下小鼠已出现明显肾功能损伤。上述结果表明,HFD+STZ 诱导的糖尿病小鼠模型能够较好地模拟 DKD 的病理生理特征(图 2A~D)。免疫荧光结果显示,在 Control 组中,IEX-1 和内皮细胞标志物 CD31 共定位,提示 IEX-1 主要表达于小鼠肾脏内皮细胞。同时,DKD 组中 IEX-1 表达明显增强,内皮细胞标志物 CD31 表达降低,提示 IEX-1 的异常升高可能与 DKD 状态下内皮细胞损伤相关(图 2E)。

2.3 IEX-1 基因敲除减轻 DKD 小鼠肾脏纤维化反应

为评估 IEX-1 在 DKD 肾纤维化中的作用,构建 IEX-1^{-/-}

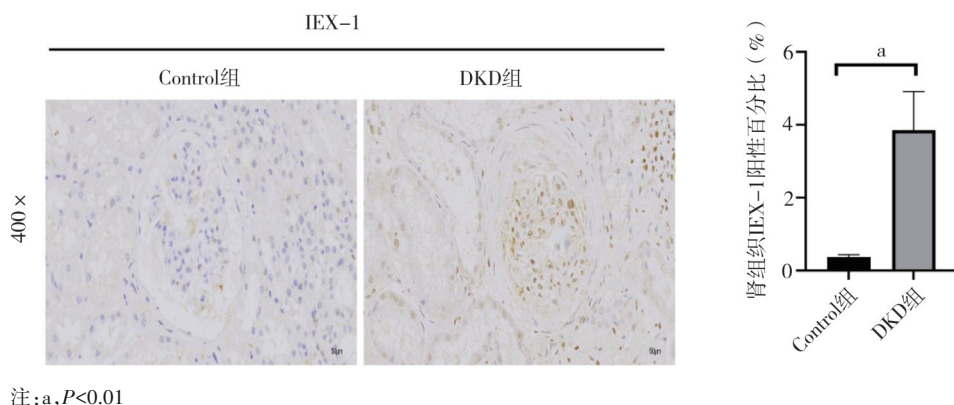
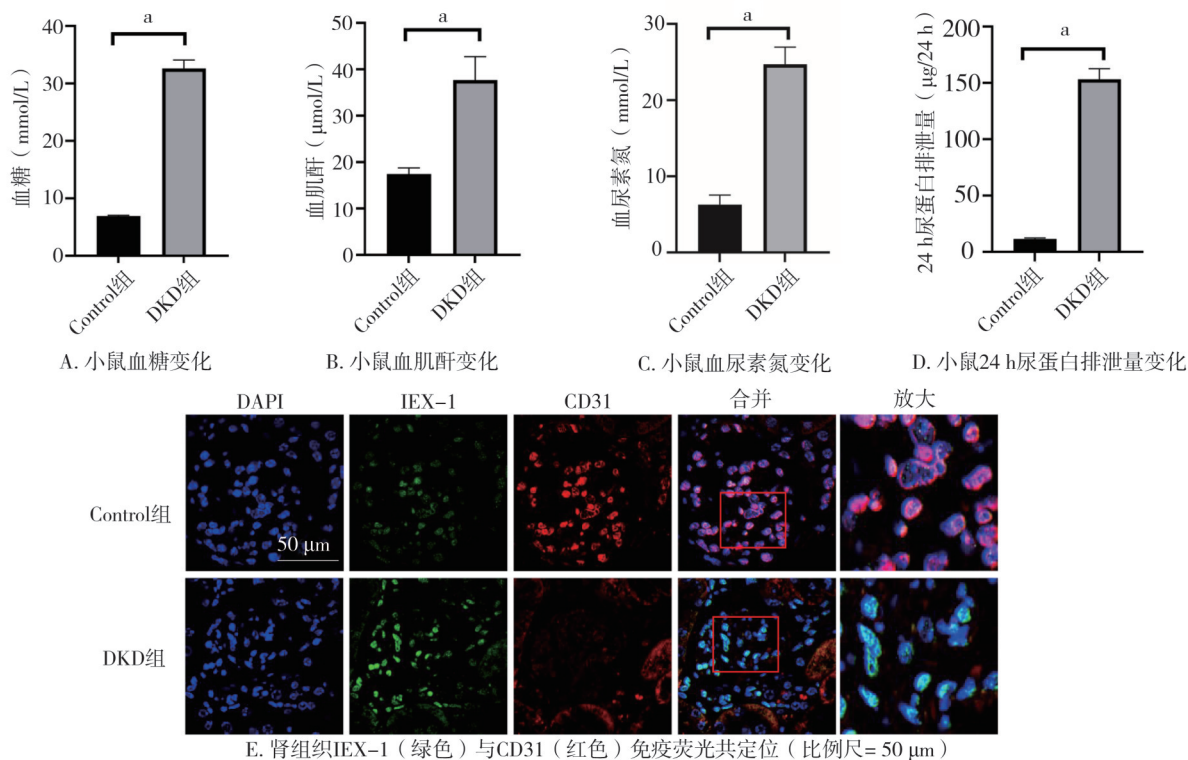


图1 各组人肾组织 IEX-1 免疫组化图及半定量分析



注:a, $P<0.001$

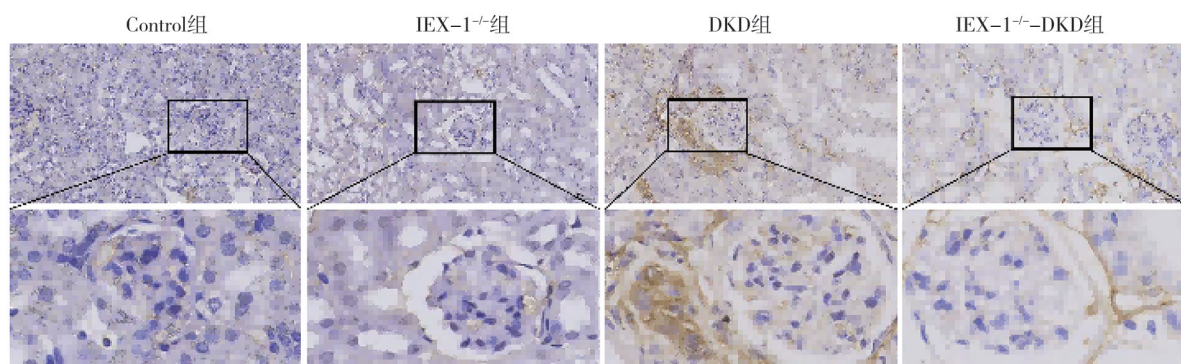
图2 各组小鼠($n=5$)建模指标和免疫荧光染色

小鼠,并采用HFD+STZ诱导DKD模型。免疫组化结果显示,与DKD组相比,IEX-1^{-/-}-DKD组纤维化相关标志物 α -SMA和COL I ($F=7.827, P=0.001$; $F=9.000, P=0.006$)表达均明显下调,提示IEX-1缺失可减轻DKD状态下的肾脏纤维化反应(图3)。

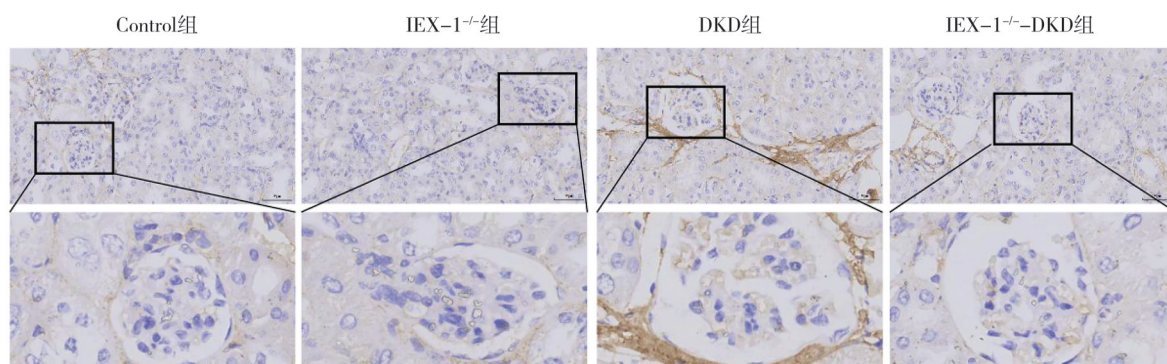
2.4 IEX-1 基因沉默缓解 HGPA 诱导的内皮细胞损伤相关促纤维化反应

在 HGPA 诱导的 HUVECs 模型中, IEX-1 表达水平升高

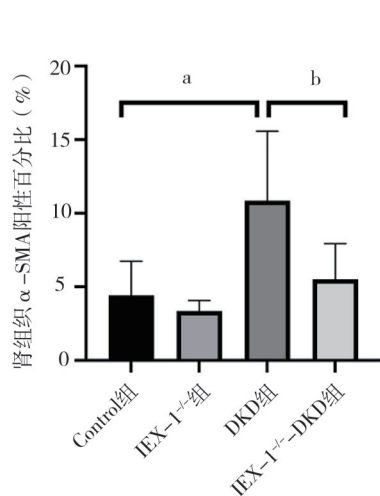
($t=9.439, P<0.01$)。与此同时,内皮细胞损伤相关指标ET-1、VCAM-1 表达上调($t=5.049, P=0.034$; $t=12.24, P<0.01$), eNOS下调($t=5.857, P<0.01$)。转染 IEX-1 siRNA 后, HGPA 诱导的内皮细胞促纤维化表型相关基因 α -SMA、COL I mRNA 水平均明显下降($F=30.820, P<0.001$; $F=7.668, P<0.05$)。上述结果提示, IEX-1 参与 HGPA 诱导的内皮细胞损伤相关促纤维化反应(图4)。



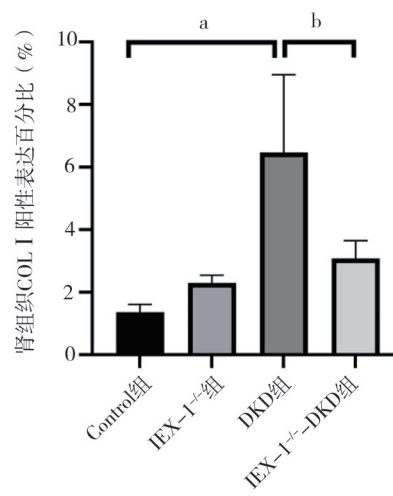
A. 肾组织 α -SMA免疫组化图(200 $\times$ 、400 $\times$)



B. 肾组织COL I免疫组化图(200 $\times$ 、400 $\times$)



C. 肾组织 α -SMA半定量分析



D. 肾组织COL I半定量分析

注:a, $P<0.001$; b, $P<0.01$

图3 各组小鼠($n=3$) α -SMA、COL I 免疫组化及半定量分析

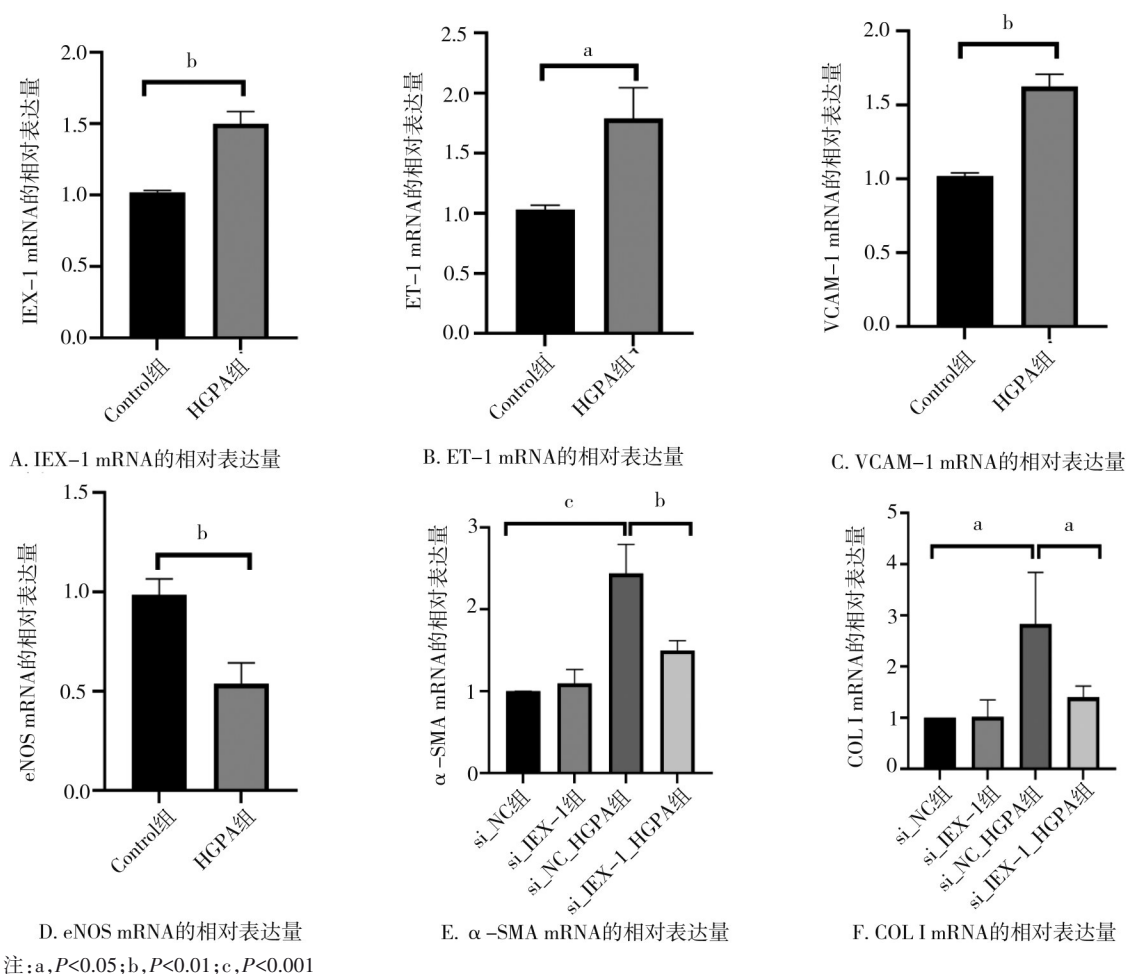


图4 HGPA刺激及IEX-1沉默后相关mRNA相对表达量

3 讨论

本研究揭示了IEX-1在DKD中的异常激活特征,提示其与肾脏内皮细胞损伤相关促纤维化反应密切相关。通过综合分析人肾组织、小鼠DKD模型以及体外内皮细胞模型,从多个层面证实了IEX-1在DKD病理进程中的作用,为理解内皮细胞损伤参与并推动肾纤维化提供了分子线索。

从机制角度来看,本研究提示IEX-1异常激活可能是糖尿病环境下代谢应激的重要分子响应。高糖及脂毒性刺激是DKD中诱发内皮细胞损伤的核心因素,可通过氧化应激、炎症信号激活及细胞稳态破坏等途径影响内皮细胞功能^[24-26]。IEX-1在应激条件下迅速上调,其异常持续表达可能放大代谢应激信号,进而加重内皮细胞功能障碍。内皮细胞损伤不仅导致血管舒缩及屏障功能受损,还可通过释放促炎和促纤维化介质,改变局部微环境,促

进成纤维细胞激活及细胞外基质沉积,从而在肾脏中形成由微血管损伤向间质纤维化转化的病理通路^[27-29]。本研究在体外实验中进一步证实,IEX-1沉默可缓解高糖联合脂毒性诱导的内皮细胞促纤维化激活,表明IEX-1在该过程中具有直接调控作用。

值得注意的是,IEX-1介导的“应激反应—细胞损伤—纤维化”调控模式可能不限于DKD。尽管本研究聚焦于DKD,但内皮功能障碍、氧化应激增强、炎症反应激活及细胞外基质沉积同样广泛存在于多种非糖尿病性肾脏疾病中,如缺血再灌注损伤、肥胖相关肾损伤及慢性肾脏病等^[30-31]。这些疾病均以微血管损伤及纤维化重塑为共同病理基础。因此,从病理生理角度推测,IEX-1通过放大细胞应激反应并促进炎症及纤维化通路激活而加重肾脏损伤的作用,可能具有跨疾病共性。上述结果提示,本研究所揭示的分子机制在非糖尿病肾病中亦具

有潜在的可行性,但其具体作用形式尚需进一步研究。

既往研究证实,内皮细胞功能障碍在 DKD 早期即已出现,并被认为是推动疾病进展的重要起始事件^[32-33]。同时,内皮细胞损伤及衰老相关的分泌表型被认为是连接慢性代谢应激与组织纤维化的重要机制^[34]。然而,调控上述过程的关键分子网络仍不完全清楚,尤其是 IEX-1 在 DKD 中的定位及功能此前尚缺乏系统性研究。本研究通过免疫荧光定位明确 IEX-1 在 DKD 条件下主要表达于肾脏内皮细胞,并通过基因敲除和 siRNA 干预策略证实其在调控促纤维化反应中的功能意义。相较于既往主要聚焦于下游炎症或纤维化通路的研究,从更上游的应激反应基因层面提供了新的解释框架,丰富了内皮细胞损伤在糖尿病肾病中的分子机制认知。

同时需要强调的是,IEX-1 作为应激诱导基因,其生物学作用不限于内皮细胞。研究表明,IEX-1 参与细胞增殖、凋亡及应激相关信号调控;鉴于肾纤维化是由肾小管上皮细胞、系膜细胞、成纤维细胞及免疫细胞等多细胞相互作用驱动的病理过程,IEX-1 还可能通过调控不同细胞类型及其串扰影响肾脏纤维化进展^[31,35-36]。本课题聚焦内皮细胞,主要基于组织定位及体外实验结果提示其在内皮细胞中表达明显且功能突出。然而,采用全身性 IEX-1 敲除模型,尚不能完全排除其他细胞类型的贡献。因此,本研究结果提示 IEX-1 在 DKD 中“可能通过介导内皮细胞损伤相关反应”促进肾纤维化形成。

尽管如此,本研究仍存在一定局限性。首先,人肾组织以及动物样本组织数量有限,且未进行分期分析,可能影响结论的外推性。其次,IEX-1^{-/-}为全身性敲除模型,尚不能区分不同细胞类型中的特异性作用。此外,体外实验模型难以完全反映体内复杂微环境。

未来可采用内皮细胞特异性条件性敲除模型,以明确 IEX-1 在内皮细胞中的细胞自主性作用,并结合多细胞类型研究其在不同肾脏疾病中的功能差异,以评估其作为肾纤维化干预靶点的潜在价值。

本研究表明 IEX-1 在 DKD 中异常高表达,并与内皮细胞损伤及肾纤维化进展密切相关。IEX-1 缺

失或沉默可减轻相关损伤及促纤维化反应,提示其在 DKD 中可能通过介导内皮细胞损伤相关机制促进肾纤维化形成。同时,IEX-1 作为应激诱导基因,可能在其他应激相关肾脏疾病中亦具有病理调控意义,但尚需进一步研究证实。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李贵:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;何俊伶:实施研究、数据收集;陈客宏:实验技术指导、病理分析;毛敏:分析数据、论文修改;左中:研究方案设计、论文修改、论文审阅

参 考 文 献

- [1] Hong Q, Zhang L, Fu J, et al. LRG1 promotes diabetic kidney disease progression by enhancing TGF- β - induced angiogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(4):546-562.
- [2] Hang X, Ma J, Wei Y, et al. Renal microcirculation and mechanisms in diabetic kidney disease[J]. Front Endocrinol, 2025, 16:1580608.
- [3] Ansari Z, Chaurasia A, Neha, et al. Exploring inflammatory and fibrotic mechanisms driving diabetic nephropathy progression[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2025, 84:120-134.
- [4] Mourya AK, Churi JP, Wahlang N, et al. NETosis in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Life Sci, 2025, 382:124038.
- [5] Ziyadeh FN. Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus[J]. Kidney Int, 1993, 43(1):114-120.
- [6] Qiao YY, Ji JL, Hou WL, et al. tRF3-IleAAT reduced extracellular matrix synthesis in diabetic kidney disease mice by targeting ZNF281 and inhibiting ferroptosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(5):1032-1043.
- [7] Luo JY, Xu HB, Su CL, et al. Polo-like kinase2 regulates renal tubulointerstitial fibrosis via Notch signaling pathway in diabetic kidney disease[J]. FASEB J, 2025, 39(5):e70455.
- [8] Burns KD. Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney [J]. Am J Kidney Dis, 2000, 36(3):449-467.
- [9] Wu JS, Wang ZH, Cai MC, et al. GPR56 promotes diabetic kidney disease through ENOS Regulation in glomerular endothelial cells[J]. Diabetes, 2023, 72(11):1652-1663.
- [10] Yang J, Liu ZS. Mechanistic pathogenesis of endothelial dysfunction in diabetic nephropathy and retinopathy[J]. Front Endocrinol, 2022, 13:816400.
- [11] Raleigh MJ, Pasricha SV, Nauth A, et al. Endothelial progenitor cells for diabetic cardiac and kidney disease[J]. Stem Cells Transl Med, 2024, 13(7):625-636.
- [12] Tanaka A, Shimabukuro M, Okada Y, et al. Rationale and design of an investigator-initiated, multicenter, prospective open-label, randomized trial to evaluate the effect of ipragliflozin on endothelial dys-

function in type 2 diabetes and chronic kidney disease: the PROCEED trial[J]. Cardiovasc Diabetol, 2020, 19(1):85.

[13] Zhang J, Chen SH, Xiang H, et al. S1PR2/Wnt3a/RhoA/ROCK1/ β -catenin signaling pathway promotes diabetic nephropathy by inducing endothelial mesenchymal transition and impairing endothelial barrier function[J]. Life Sci, 2023, 328: 121853.

[14] Zheng LQ, Chen WM, Yao KJ, et al. Mechanism of mesenchymal stem cells in treating diabetic kidney disease[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1):629.

[15] Rana R, Manoharan J, Gupta A, et al. Activated protein C ameliorates tubular mitochondrial reactive oxygen species and inflammation in diabetic kidney disease[J]. Nutrients, 2022, 14(15):3138.

[16] Zhang Y, Chen XL, Fan YP, et al. XCL1 aggravates diabetic nephropathy-mediated renal glomerular endothelial cell apoptosis and inflammatory response *via* regulating p53/nuclear factor- κ B pathway[J]. Nephron, 2022, 146(1):84-98.

[17] Wu MX. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis[J]. Apoptosis, 2003, 8(1):11-18.

[18] Schilling D, Pittelkow MR, Kumar R. IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes[J]. Oncogene, 2001, 20(55):7992-7997.

[19] Kumar R, Pittelkow MR, Salisbury JL, et al. A novel vitamin D-regulated immediate-early gene, IEX-1, alters cellular growth and apoptosis[C]//Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003: 123-134.

[20] Shen L, Guo JJ, Santos-Berrios C, et al. Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1[J]. J Biol Chem, 2006, 281(22):15304-15311.

[21] Singh AK, Cai CQ, Kilari S, et al. $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 encapsulated in nanoparticles prevents venous neointimal hyperplasia and stenosis in porcine arteriovenous fistulas[J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(4):866-885.

[22] De Keulenaer GW, Wang YL, Feng YJ, et al. Identification of IEX-1 as a biomechanically controlled nuclear factor- κ B target gene that inhibits cardiomyocyte hypertrophy[J]. Circ Res, 2002, 90(6):690-696.

[23] Feldmann KA, Pittelkow MR, Roche PC, et al. Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues[J]. Histochem Cell Biol, 2001, 115(6):489-497.

[24] Palau V, Jarrín J, Villanueva S, et al. Endothelial ADAM17 expression in the progression of kidney injury in an obese mouse model of pre-diabetes[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(1):221.

[25] Li X, Zhang T, Geng J, et al. Advanced oxidation protein products

promote lipotoxicity and tubulointerstitial Fibrosis *via* CD36/ β -catenin pathway in diabetic nephropathy[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31(7):521-538.

[26] Opazo-Ríos L, Mas S, Marín-Royo G, et al. Lipotoxicity and diabetic nephropathy: novel mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7):2632.

[27] Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, et al. Nitric oxide and endothelial dysfunction[J]. Crit Care Clin, 2020, 36(2):307-321.

[28] Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(2):87-108.

[29] Yuan Y, Liu L, Chen NZ, et al. Shenqi compound ameliorates renal fibrosis in diabetic kidney disease by inhibiting LRG1/TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2025, 148: 157355.

[30] Yuan Q, Tang B, Zhang C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7:182.

[31] Wu QL, Zhang DB, Dai SQ, et al. Desflurane attenuates renal ischemia-reperfusion injury by modulating ITGB1/CD9 and reducing oxidative stress in tubular epithelial cells[J]. Redox Biol, 2025, 80: 103490.

[32] Nakagawa T, Tanabe K, Croker BP, et al. Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(1):36-44.

[33] Leung WK, Gao L, Siu PM, et al. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: current and future therapies, and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study[J]. Life Sci, 2016, 166: 121-130.

[34] Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, et al. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(1):38-51.

[35] Mahale S, Setia M, Prajapati B, et al. HnRNPK maintains single strand RNA through controlling double-strand RNA in mammalian cells[J]. Nat Commun, 2022, 13:4865.

[36] Huang RS, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8:129.

(收稿:2026-02-24;修回:2026-04-18;录用:2026-05-08)

(责任编辑:曾 玲)

本文引用格式:

李 贵,何俊伶,陈客宏,等. IEX-1 通过介导内皮细胞损伤促进糖尿病肾病肾纤维化的作用及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(9):1257-1264.