

TRPC6 对糖尿病肾病小鼠肾小管间质炎症的影响及其机制

刘丛聪¹ 张行健¹ 丁琳² 张瑶¹ 张栋杰¹ 马瑞霞¹

(1 青岛大学附属医院肾内科, 山东 青岛 266003; 2 湖北民族大学附属民大医院肾病内科)

[摘要] 目的 探讨瞬时受体电位阳离子通道 6 (TRPC6) 对糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 小鼠肾小管间质炎症的影响及其机制。方法 将 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只随机分为 6 组, 每组 6 只。对照组 (A 组) 和 DKD 组 (B 组) 分别腹腔注射 0.1 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液和 10 g/L 链脲佐菌素 (后简称给药); DKD+生理盐水干预组 (C 组) 和 DKD+线粒体自噬激活剂干预组 (D 组) 在 B 组基础上分别灌胃生理盐水和 10 mmol/L 尿石素 A; DKD+阴性对照慢病毒转染组 (E 组) 和 DKD+TRPC6 敲降慢病毒转染组 (F 组) 在 B 组基础上分别尾静脉注射阴性对照慢病毒和 TRPC6 敲降慢病毒。测定各组小鼠给药后第 12 周时的全血空腹血糖 (FBG) 水平、尿微量白蛋白肌酐比 (ACR) 和血尿素氮 (BUN) 水平, PAS 染色观察小鼠肾小管损伤情况并进行评分, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测小鼠肾组织中炎症因子 (*IL-1 β* , *MCP-1*, *TNF- α*) mRNA 水平, 免疫组织化学染色观察小鼠肾组织中 TRPC6 蛋白表达水平, 蛋白免疫印迹检测小鼠肾组织中 TRPC6、LC3B、P62、PINK1、Parkin 相对表达量, 透射电镜观察小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量变化。将 HK-2 细胞分为高糖+TRPC6 siRNA+DMSO 干预组 (G 组, TRPC6 siRNA 转染+35.0 mmol/L 葡萄糖+0.06% DMSO) 和高糖+TRPC6 siRNA+线粒体自噬抑制剂干预组 (H 组, TRPC6 siRNA 转染+35.0 mmol/L 葡萄糖+12 μ mol/L 千层纸素 A), RT-qPCR 技术检测细胞中炎症因子 (*IL-1 β* , *MCP-1*, *TNF- α*) mRNA 的水平。结果 给药后第 12 周时, B 组小鼠全血 FBG 水平、ACR、BUN 水平、肾小管损伤评分、肾组织炎症因子 mRNA 水平及 TRPC6、P62 蛋白表达水平均显著高于 A 组 ($t=2.77\sim 13.61$, $P<0.05$), 肾组织 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 蛋白表达水平显著低于 A 组 ($t=3.33\sim 14.63$, $P<0.05$), 肾小管细胞中线粒体自噬体数量减少; D 组小鼠 ACR、BUN 水平、肾小管损伤评分、肾组织炎症因子 mRNA 水平及 P62 蛋白表达水平显著低于 C 组 ($t=2.40\sim 23.50$, $P<0.05$), 肾组织 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 蛋白表达水平显著高于 C 组 ($t=5.74\sim 12.50$, $P<0.05$), 肾小管细胞中线粒体自噬体数量增多; F 组小鼠 ACR、BUN 水平、肾小管损伤评分、肾组织炎症因子 mRNA 水平及 TRPC6、P62 蛋白表达水平均显著低于 E 组 ($t=2.45\sim 7.09$, $P<0.05$), 肾组织 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 蛋白表达水平显著高于 E 组 ($t=7.91\sim 13.18$, $P<0.05$), 肾小管细胞中线粒体自噬体数量增多; H 组细胞的炎症因子 mRNA 水平显著高于 G 组 ($t=5.40\sim 7.27$, $P<0.05$)。结论 TRPC6 可通过上调自身表达, 抑制肾小管细胞线粒体自噬, 从而加重 DKD 小鼠的肾小管间质炎症。TRPC6 抑制药物有望用于 DKD 治疗。

[关键词] 糖尿病肾病; TRPC 阳离子通道; 线粒体自噬; 肾炎, 间质性; 疾病模型, 动物; 小鼠, 近交 C57BL

[中图分类号] R587.24; R692.33

[文献标志码] A

Influence of transient receptor potential cation channel 6 on renal tubulointerstitial inflammation in mice with diabetic kidney disease and its mechanism

LIU Congcong, ZHANG Xingjian, DING Lin, ZHANG Yao, ZHANG Dongjie, MA Ruixia (Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influence of transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6) on renal tubulointerstitial inflammation in mice with diabetic kidney disease (DKD) and its mechanism. **Methods** A total of 36 male C57/BL6J mice, aged 6 weeks, were randomly divided into control group (group A), DKD model group (group B), DKD+normal saline intervention group (group C), DKD+mitophagy activator intervention group (group D), DKD+negative control lentivirus transfection group (group E), and DKD+TRPC6 knockdown lentivirus transfection group (group F), with 6 mice in each group.

The mice in groups A and B were respectively given intraperitoneal injection of 0.1 mmol/L citrate buffer and 10 g/L streptozotocin (hereinafter referred to as administration); the mice in groups C and D were respectively given normal saline and 10 mmol/L urolithin A by gavage in addition to the treatment in group B; the mice in groups

[收稿日期] 2024-03-23; **[修订日期]** 2024-06-17

[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2022MH-161); 泰山学者工程专项项目 (tstp20230665); 青岛市医药卫生科研计划项目 (2021-WJZD189); 青岛市医疗卫生重点学科建设项目; 青岛市临床重点专科

[通讯作者] 马瑞霞, Email: anita1685@163.com

E and F were respectively injected with negative control lentivirus and *TRPC6* knockdown lentivirus via the tail vein in addition to the treatment in group B. The levels of fasting blood glucose (FBG), urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR), and blood urea nitrogen (BUN) were measured at week 12 after administration; PAS staining was used for the observation and scoring of renal tubular injury; RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of inflammatory factors [interleukin-1 β (*IL-1 β*), monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*)] in renal tissue; immunohistochemical staining was used to measure the protein expression level of *TRPC6* in renal tissue, and Western blotting was used to measure the relative expression levels of *TRPC6*, *LC3B*, *P62*, *PINK1*, and *Parkin* in renal tissue; transmission electron microscopy was used to observe the change in the number of mitophagosomes in renal tubular cells of mice. HK-2 cells were divided into high glucose+*TRPC6* siRNA transfection+DMSO intervention group (group G, treated with *TRPC6* siRNA+35.0 mmol/L glucose+0.06% DMSO) and high glucose+*TRPC6* siRNA transfection+mitophagy inhibitor intervention group (group H, treated with *TRPC6* siRNA+35.0 mmol/L glucose+12 μ mol/L oroxylin A), and then RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of inflammatory factors (*IL-1 β* , *MCP-1*, and *TNF- α*) in cells. **Results** At week 12 after administration, compared with group A, group B had significantly higher whole blood FBG, ACR, BUN, renal tubular injury score, mRNA expression levels of inflammatory factors, and protein expression levels of *TRPC6* and *P62* in renal tissue ($t=2.77-13.61, P<0.05$) and significantly lower protein expression levels of *LC3B-II/LC3B-I*, *PINK1*, and *Parkin* in renal tissue ($t=3.33-14.63, P<0.05$), with a reduction in the number of mitophagosomes in renal tubular cells. Compared with group C, group D had significantly lower levels of ACR and BUN, renal tubular injury score, mRNA expression levels of inflammatory factors, and protein expression level of *P62* in renal tissue ($t=2.40-23.50, P<0.05$) and significantly higher protein expression levels of *LC3B-II/LC3B-I*, *PINK1*, and *Parkin* in renal tissue ($t=5.74-12.50, P<0.05$), with an increase in the number of mitophagosomes in renal tubular cells. Compared with group E, group F had significantly lower levels of ACR and BUN, renal tubular injury score, mRNA expression levels of inflammatory factors, and protein expression levels of *TRPC6* and *P62* in renal tissue ($t=2.45-7.09, P<0.05$) and significantly higher protein expression levels of *LC3B-II/LC3B-I*, *PINK1*, and *Parkin* in renal tissue ($t=7.91-13.18, P<0.05$), with an increase in the number of mitophagosomes in renal tubular cells. Group H had significantly higher mRNA expression levels of inflammatory factors than group G ($t=5.40-7.27, P<0.05$). **Conclusion** *TRPC6* can aggravate renal tubulointerstitial inflammation by upregulating its expression and inhibiting mitophagy in renal tubular cells. Therefore *TRPC6* inhibitors are promising for the treatment of DKD disease.

[KEY WORDS] Diabetic nephropathies; TRPC cation channels; Mitophagy; Nephritis, interstitial; Disease models, animal; Mice, inbred C57BL

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 微血管并发症, 是导致终末期肾病的主要原因之一。DKD 的发病机制包括肾脏基底膜增厚、足细胞丢失、系膜扩张、肾小管萎缩、间质炎症和纤维化等^[1]。有研究表明, 肾小管损伤及其继发的肾小管间质炎症是 DKD 进展的特征性病理改变^[2-3]。瞬时受体电位阳离子通道 6 (*TRPC6*) 是一类 Ca^{2+} 通透的非选择性阳离子通道, 在各种刺激下介导肾脏细胞中 Ca^{2+} 水平的增加^[4]。据报道, *TRPC6* 在肾小管上皮细胞 (TECs) 的细胞质中表达^[5], 并通过抑制 TECs 中 NFAT 信号通路促进 TECs 炎症和纤维化^[6-7]。*TRPC6* 敲降可以通过激活 TECs 自噬来抑制氧化应激所致的 TECs 凋亡^[8]。TECs 作为线粒体最丰富的细胞之一, 易受线粒体功能障碍的影响, 线粒体自噬功能障碍是导致线粒体稳态紊乱的重要原因之一。线粒体自噬在细胞炎症的发生发展中发挥关键调节作用, 线粒体自噬调节基因表达的减少会导致线粒体质量控制缺陷, 从而导致细胞炎症^[9]。越来越多的研究表明, 线粒体自噬对 DKD 的发生和发展具有显著促

进作用, DKD 患者及 DKD 模型小鼠均存在肾脏细胞线粒体自噬功能障碍情况^[10-11]。本研究拟探讨 *TRPC6* 对 DKD 小鼠肾小管间质炎症的影响及其机制, 旨在为 DKD 的治疗提供实验数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源

6 周龄雄性健康 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司, HK-2 细胞由东南大学肾脏病研究所惠赠。链脲佐菌素、P62 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 慢病毒购买于上海吉玛制药技术有限公司, 尿石素 A、千层纸素 A 均购买于美国 MedChemExpress 生物科技公司, 肌酐、尿素氮试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 小鼠尿微量白蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 生理盐水、DMSO、组织线粒体分离试剂盒购买于上海碧云天生物技术有限公司, *TRPC6*、*PINK1*、*COX-IV* 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, *Parkin* 抗体购买于美国 Santa Cruz 生物技术有限公司, *LC3B* 抗体、辣根过氧化物酶标记的山

羊抗小鼠和抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体购自上海泊湾生物技术有限公司, ECL 化学发光液购自北京 Biosharp 公司, PCR 引物购买于上海捷瑞生物工程有限公司, RNA isolater 总 RNA 提取试剂、HiScript III RT Super-Mix 试剂、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 血糖仪与血糖试纸购自德国贝朗公司, 逆转录仪购自德国艾本德股份公司, 7300 Real-time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 小鼠的分组及处理

将 36 只 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组(A 组)、DKD 组(B 组)、DKD+生理盐水灌胃组(C 组)、DKD+线粒体自噬激活剂灌胃组(D 组)、DKD+阴性对照慢病毒组(E 组)、DKD+TRPC6 敲降慢病毒组(F 组)共 6 组, 每组 6 只。B~F 组连续 5 d 每天腹腔注射(后简称给药)10 g/L 的链脲佐菌素 50 mg/kg, A 组则连续每天给予等体积柠檬酸盐缓冲液。给药后第 4 周开始, D 组每天灌胃浓度为 10 mmol/L 的尿石素 A 50 mg/kg, C 组每天灌胃等体积生理盐水, 连续处理 8 周。给药后第 8 周开始, F 组每只小鼠每周通过尾静脉注射滴度为 1×10^9 的 TRPC6 敲降慢病毒 50 μ L, E 组每只小鼠每周通过尾静脉注射等量阴性对照慢病毒, 连续 4 周。所有小鼠均于给药后第 12 周脱颈处死。

1.3 人肾皮质近曲小管上皮(HK-2)细胞的分组及处理

将复苏后的 HK-2 细胞置于含体积分数 0.1 的胎牛血清、10 g/L 青-链霉素混合液的 DMEM/F12 培养基中, 随机分为高糖+TRPC6 siRNA 转染+线粒体自噬抑制剂干预组(H 组)及高糖+TRPC6 siRNA 转染+DMSO 干预组(G 组)。H 组将 HK-2 细胞转染 TRPC6 siRNA 后, 置于含 35.0 mmol/L 葡萄糖及 12 μ mol/L 千层纸素 A 的 DMEM/F12 培养基中, G 组将 HK-2 细胞转染 TRPC6 siRNA 后, 置于含 35.0 mmol/L 葡萄糖及 0.06% DMSO 的 DMEM/F12 培养基中, 两组细胞均置于 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中培养 48 h。

1.4 各组小鼠全血空腹血糖(FBG)水平、尿微量白蛋白肌酐比(ACR)和血尿素氮(BUN)水平测定

于给药后第 12 周时, 检测各组小鼠全血 FBG 水平; 收集各组小鼠 24 h 的尿液, 按小鼠尿微量白蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒和肌酐试剂盒说明书检测尿液中微量白蛋白、肌酐水平, 并计算 ACR; 另

取各组小鼠眼球血分离血清, 按尿素氮测定试剂盒说明书检测 BUN 水平。上述检测均重复 3 次, 结果取均值。

1.5 过碘酸希夫(PAS)染色观察各组小鼠肾小管损伤情况

所有小鼠均于给药后第 12 周时脱颈处死, 分离取出双侧肾脏。取各组小鼠部分肾组织标本用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切片, 进行 PAS 染色之后, 置于光学显微镜下观察然后拍照。随机选取每组小鼠的肾组织切片中 20 处皮质区域的 PAS 染色图像, 由观察者采用盲法对小鼠肾小管损伤情况进行评分^[12]。

1.6 免疫组化染色观察 A、B、E、F 组小鼠肾组织胞浆蛋白 TRPC6 表达

取 1.5 中 A、B、E、F 组小鼠肾组织切片, 抗原修复后滴加过氧化物酶阻断剂和正常非免疫动物血清, 在 4 $^{\circ}$ C 下与 TRPC6 一抗(1:200)孵育过夜。复温后滴加过氧化物酶标记的鼠/兔 IgG 二抗, 室温下孵育 2 h。将配制的 DAB 显色液滴加在组织上, 显微镜下显色观察, 苏木素滴染后使用体积分数 0.80、0.85、0.95、1.00 的乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。置于光学显微镜下观察、拍照并保存图片。

1.7 免疫印迹法检测小鼠肾组织胞浆蛋白 TRPC6 及线粒体蛋白相对表达水平

取 1.5 中 A、B、E、F 组小鼠肾组织标本, 检测肾组织中胞浆蛋白 TRPC6 相对表达水平; 取所有组小鼠肾组织标本, 分离肾组织线粒体, 同时检测肾组织线粒体中各种蛋白[微管相关蛋白 1 轻链 β 3(LC3B)、泛素结合蛋白 P62、PTEN 诱导假定激酶 1(PINK1)、E3 连接酶 Parkin]相对表达水平。采用组织线粒体分离试剂盒分离各组小鼠肾组织线粒体, RIPA 裂解肾组织及线粒体, 并用二喹啉甲酸测定蛋白浓度。在提取的总蛋白中加入上样缓冲液和双蒸水, 制成等浓度等体积的蛋白样本, 充分混匀, 于 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳加载处理后的蛋白质, 并转移到聚偏二氟乙烯膜上。然后将膜置于 NcmBlot 封闭缓冲液中封闭 20 min, 并在 4 $^{\circ}$ C 下与 TRPC6(1:1 000)、胞浆蛋白内参 β -actin(1:10 000)、LC3B(1:1 000)、P62(1:1 000)、PINK1(1:1 000)、Parkin(1:1 000)和线粒体蛋白内参 COX-IV(1:5 000)的一抗孵育过夜。用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或抗兔 IgG(1:3 000)在室温下孵育

1 h 后,化学发光增强系统显影上述蛋白印迹并拍照。使用 Image J 软件分析 TRPC6、 β -actin、LC3B-II/LC3B-I、P62、PINK1、Parkin、COX-IV 蛋白条带灰度值,蛋白相对表达量以蛋白灰度值/内参灰度值计算,结果取 3 次重复实验的均值。

1.8 RT-qPCR 检测各组小鼠肾组织及各组 HK-2 细胞中炎症因子 ($IL-1\beta$ 、MCP-1、TNF- α) mRNA 表达水平

使用 RNA isolater 总 RNA 提取试剂提取 A~F 组小鼠肾组织中以及 G、H 组 HK-2 细胞中的总 RNA,使用 HiScript III RT SuperMix 试剂在逆转录仪当中逆转录 mRNA,然后用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂在 7300 Real-time PCR 仪中检测 $IL-1\beta$ 、MCP-1、TNF- α mRNA 表达水平。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算以上各 mRNA 的相对表达水平。所使用的引物名称及其序列见表 1。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
Mus- β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3'	20
	R:5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	21
Mus-IL-1 β	F:5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	22
	R:5'-TGGATGCTTCATCAGGACAG-3'	21
Mus-MCP-1	F:5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA-3'	23
	R:5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3'	23
Mus-TNF- α	F:5'-CTGAACCTCGGGGTGATCGG-3'	20
	R:5'-GGCTTGCACTCGAATTTTGAGA-3'	23
Homo- β -actin	F:5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'	20
	R:5'-GTAGCCAGGATGCCCTTGA-3'	20
Homo-IL-1 β	F:5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	23
	R:5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'	20
Homo-MCP-1	F:5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'	21
	R:5'-TGGAATCTGAACCCACTTCT-3'	21
Homo-TNF- α	F:5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3'	19
	R:5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'	19

1.9 透射电镜观察各组小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量

取各组小鼠部分肾组织标本,使用 2.5%戊二醛固定后浸泡在 1%四氧化锇中,用体积分数 0.5、0.7、0.8、0.9 的丙酮梯度脱水,包埋后制作超薄 (50~70 nm)切片,用醋酸铀和柠檬酸铅对其进行染色,最后在透射电镜下观察并拍照。

1.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠给药后第 12 周时全血 FBG、BUN 水平及 ACR 比较

第 12 周时,B 组小鼠给药后全血 FBG、BUN 水平以及 ACR 均显著高于 A 组 ($t=2.77\sim 5.71, P<0.05$);D 组小鼠 ACR 及 BUN 水平显著低于 C 组 ($t=2.40, 3.50, P<0.05$);F 组小鼠 ACR 及 BUN 水平显著低于 E 组 ($t=2.45, 3.81, P<0.05$)。见表 2。

表 2 A~F 组小鼠给药后第 12 周时全血 FBG、BUN 水平及 ACR 比较 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	全血 FBG 水平 ($c/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ACR ($\omega\times 10^{-3}$)	BUN 水平 ($c/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
A 组	10.47 \pm 1.72	0.97 \pm 0.05	2.32 \pm 0.19
B 组	25.43 \pm 6.18	2.24 \pm 0.78	4.58 \pm 1.99
C 组	25.80 \pm 4.18	3.58 \pm 1.32	4.51 \pm 1.39
D 组	21.83 \pm 3.79	2.15 \pm 0.62	2.35 \pm 0.58
E 组	23.83 \pm 3.14	2.76 \pm 0.77	4.49 \pm 1.24
F 组	25.45 \pm 4.20	1.87 \pm 0.45	2.48 \pm 0.38

2.2 各组小鼠肾组织 PAS 染色及肾小管损伤情况比较

A~F 组肾小管损伤评分分别为 (1.10 \pm 0.57)、(2.90 \pm 0.74)、(3.00 \pm 0.67)、(2.00 \pm 0.67)、(3.00 \pm 0.47)、(2.30 \pm 0.67)分。与 A 组相比,B 组小鼠肾小管萎缩、TECs 脱落和刷状缘缺失,肾小管损伤评分值显著升高 ($t=6.11, P<0.05$);与 C 组相比,D 组小鼠肾小管萎缩、TECs 脱落和刷状缘缺失的情况得到明显改善,肾小管损伤评分值显著降低 ($t=3.35, P<0.05$);与 E 组相比,F 组小鼠肾小管萎缩、TECs 脱落和刷状缘缺失的情况得到明显改善,肾小管损伤评分值显著降低 ($t=2.69, P<0.05$)。见图 1。

2.3 各组小鼠肾组织中及各组细胞中炎症因子 mRNA 表达水平比较

RT-qPCR 结果显示,B 组小鼠肾组织当中 $IL-1\beta$ 、MCP-1、TNF- α 的 mRNA 表达水平显著高于 A 组 ($t=5.49\sim 7.79, P<0.05$);D 组小鼠肾组织中以上炎症因子 mRNA 表达水平显著低于 C 组 ($t=4.29\sim 8.80, P<0.05$);F 组小鼠肾组织中以上炎症因子 mRNA 表达水平显著低于 E 组 ($t=4.44\sim 6.11, P<0.05$);H 组细胞中以上炎症因子 mRNA 表达水平显著高于 G 组 ($t=5.40\sim 7.27, P<0.05$)。见表 3。

2.4 各组小鼠肾组织胞浆蛋白 TRPC6 免疫组化染色以及胞浆蛋白 TRPC6、线粒体蛋白 (LC3B、P62、

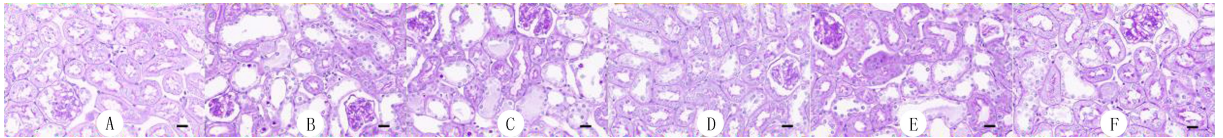
PINK1、Parkin)表达水平比较

免疫组化染色结合蛋白免疫印迹结果显示,B组肾组织中胞浆蛋白 TRPC6 表达水平显著高于 A 组($t=13.61, P<0.05$),F 组小鼠肾组织 TRPC6 表达显著低于 E 组($t=6.08, P<0.05$)。见图 2~3、表 4。蛋白免疫印迹结果显示,与 A 组相比,B 组小鼠肾组织线粒体蛋白 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 相对表达水平显著降低,P62 相对表达水平显著升高($t=3.33\sim 14.63, P<0.05$);与 C 组相比,D 组小鼠肾组织线粒体蛋白 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 相对表达水平显著升高,P62 相对表达水平显著降低($t=5.74\sim 23.50, P<0.05$);与 E 组相比,F 组小鼠肾组织中线粒体蛋白 LC3B-II/

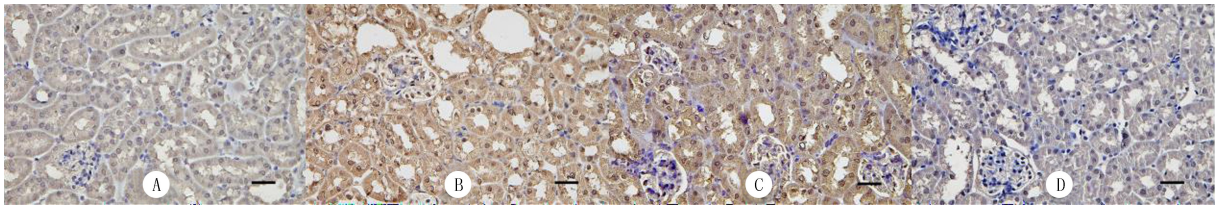
LC3B-I 及 PINK1、Parkin 相对表达水平均显著升高,P62 相对表达水平显著降低($t=7.09\sim 13.18, P<0.05$)。见图 4、表 4。

表 3 各组小鼠肾组织中及各组细胞中炎症因子 mRNA 表达水平比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>IL-1β</i>	<i>MCP-1</i>	<i>TNF-α</i>
A 组	1.02 \pm 0.21	1.07 \pm 0.22	1.02 \pm 0.20
B 组	2.86 \pm 0.54	3.43 \pm 1.03	2.63 \pm 0.67
C 组	1.01 \pm 0.12	0.98 \pm 0.11	0.98 \pm 0.21
D 组	0.45 \pm 0.12	0.39 \pm 0.12	0.54 \pm 0.14
E 组	0.97 \pm 0.16	1.00 \pm 0.16	1.01 \pm 0.18
F 组	0.46 \pm 0.19	0.66 \pm 0.10	0.44 \pm 0.13
G 组	0.96 \pm 0.12	0.93 \pm 0.16	1.00 \pm 0.13
H 组	1.34 \pm 0.12	1.67 \pm 0.22	2.21 \pm 0.39



A~F 分别表示 A~F 组
图 1 A~F 组小鼠肾组织 PAS 染色结果(400 倍)



A、B、C、D 分别表示 A、B、E、F 组
图 2 A、B、E、F 组小鼠肾组织 TRPC6 免疫组化染色结果(400 倍)

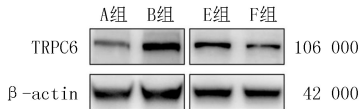


图 3 A、B、E、F 组小鼠肾组织胞浆蛋白 TRPC6 免疫印迹结果

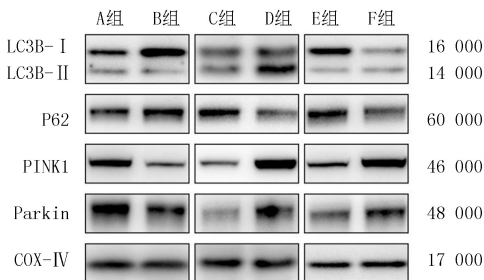


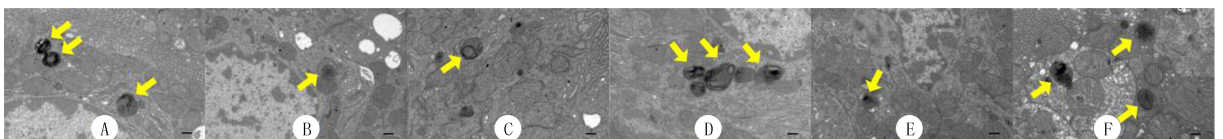
图 4 A~F 组小鼠肾组织线粒体蛋白 LC3B、P62、PINK1、Parkin 免疫印迹结果

表 4 A~F 组小鼠肾组织胞浆蛋白 TRPC6 及线粒体蛋白 LC3B、P62、PINK1、Parkin 表达水平比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TRPC6	LC3B-II / LC3B-I	P62	PINK1	Parkin
A 组	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.10
B 组	1.65 \pm 0.11	0.75 \pm 0.08	1.20 \pm 0.09	0.56 \pm 0.06	0.52 \pm 0.08
C 组	—	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.07
D 组	—	1.40 \pm 0.15	0.42 \pm 0.05	1.85 \pm 0.08	1.64 \pm 0.10
E 组	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.13
F 组	0.64 \pm 0.13	1.75 \pm 0.08	0.75 \pm 0.06	1.72 \pm 0.18	1.65 \pm 0.15

2.5 各组小鼠肾小管细胞透射电镜观察结果比较

透射电镜观察结果显示,B 组小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量少于 A 组,C 组小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量多于 D 组,E 组小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量多于 F 组。见图 5。



A~F 分别表示 A~F 组,黄色箭头指示线粒体自噬体
图 5 小鼠肾小管细胞透射电镜观察结果(10 000 倍)

3 讨 论

DKD 是 DM 患者最严重的微血管并发症之一,是一种慢性进行性疾病。肾小管间质炎症是 DKD 的重要病理特征之一,其进展最终导致间质纤维化。既往认为 DKD 是一种肾小球疾病,肾小管损伤被认为继发于肾小球损伤。然而,越来越多的证据支持 DKD 的肾小管间质损伤也可能始于原发性肾小管损伤^[13]。本研究结果显示,给药后第 12 周时 B 组小鼠全血 FBG 水平、ACR、BUN 水平、肾小管损伤评分及肾组织炎性因子 mRNA 水平均明显高于 A 组,提示 DKD 小鼠出现肾小管损伤,肾小管间质炎症加重。

肾小管细胞易受线粒体功能障碍的影响。受损的线粒体无法供给足够的 ATP,从而导致肾小管细胞萎缩或去分化^[14]。严重的线粒体损伤和线粒体清除功能障碍可导致线粒体 DNA(mtDNA)泄漏到细胞质中,而肾小管细胞中 mtDNA 的异常包装导致其在细胞质中易位,激活环磷酸鸟苷-腺苷磷酸合成酶-干扰素基因刺激因子信号通路,从而导致细胞因子表达和免疫细胞募集^[15]。此外,缺陷线粒体不能维持跨越线粒体内膜的质子梯度,因而导致肾小管细胞产生大量活性氧,加重肾小管间质炎症^[16]。本研究结果显示,与 A 组相比,B 组小鼠肾组织中 LC3B-II/LC3B-I 以及 PINK1、Parkin 蛋白表达减少,P62 蛋白表达增加,电镜下 B 组小鼠肾小管细胞中线粒体自噬体数量减少,提示 DKD 小鼠肾小管细胞中 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬受到抑制。使用尿石素 A 激活线粒体自噬后的 D 组小鼠肾组织 ACR、BUN 水平、肾小管损伤评分及肾组织炎性因子 mRNA 水平均显著低于 C 组,提示激活肾小管细胞线粒体自噬可减轻 DKD 小鼠的肾小管损伤和肾小管间质炎症,该结果与既往研究报道的结果相似^[17]。但目前 DKD 肾小管自噬抑制的具体机制尚未完全清楚。

TRPC6 是一类广泛存在于各种肾脏细胞膜上的蛋白质,能够介导 Ca^{2+} 内流进入细胞。DKD 中 TRPC6 通道活性受到血管紧张素 II、ATP、蛋白酶激活受体激动剂和其他内源性因素的调节,刺激磷脂酶 C 偶联受体可激活 TRPC6,从而诱导 Ca^{2+} 进入细胞并刺激钙调磷酸酶^[18]。本研究中 B 组小鼠肾组织 TRPC6 表达显著高于 A 组,F 组小鼠肾组织 ACR、BUN 水平、肾小管损伤分数及肾组织炎性因子 mRNA 水平均显著低于 E 组,提示敲降 TR-

PC6 可减轻 DKD 肾小管损伤和肾小管间质炎症。同时,与 E 组相比较,F 组小鼠肾组织中 LC3B-II/LC3B-I 及 PINK1、Parkin 蛋白表达增加,P62 蛋白表达减少,电镜下肾小管细胞中线粒体自噬体数量增多,提示 TRPC6 敲降的 DKD 小鼠肾小管细胞中 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬抑制得到改善。体外细胞实验中,在敲降 TRPC6 的基础上使用线粒体自噬抑制剂干预后,H 组细胞的炎性因子 mRNA 水平显著高于 G 组,说明敲降 TRPC6 对肾小管间质炎症的改善作用几乎被线粒体自噬抑制剂消除,进一步说明 TRPC6 通过抑制线粒体自噬加重了 DKD 小鼠肾小管间质炎症。

综上所述,TRPC6 表达上调可通过抑制线粒体自噬加剧高糖诱导的小鼠肾小管炎性损伤和 DKD。本研究首次阐述了 DKD 中 TRPC6 与线粒体自噬的相关性,但上述结论还需后续更严谨的实验验证,且需对 TRPC6 抑制线粒体自噬的具体机制进行探讨。既往研究结果显示,包括 AMPK、NOX4 以及 Klotho 在内的多种信号通路均能够抑制肾组织当中 TRPC6 的表达,miR-26a-5p 也可以减弱 DKD 中 TRPC6 活化,从而改善 DKD 中肾小球或肾小管间质病变^[19-22]。在此背景下,TRPC6 抑制药物有望用于 DKD 治疗,本研究为延缓 DKD 肾小管间质炎症进展提供了治疗策略及理论依据。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学附属医院实验动物福利伦理委员会的审核批准(文件号 QY-FYWZLL28812)。所有实验过程均遵照《实验动物福利伦理审查指南》的条例进行。

作者声明:刘丛聪、马瑞霞、张行健参与了研究设计;刘丛聪、张行健、丁琳、张瑶、张栋杰参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] AHMAD A A, DRAVES S O, ROSCA M. Mitochondria in diabetic kidney disease[J]. Cells, 2021,10(11):2945.
- [2] JIANG W J, XU C T, DU C L, et al. Tubular epithelial cell-to-macrophage communication forms a negative feedback loop via extracellular vesicle transfer to promote renal inflammation and apoptosis in diabetic nephropathy[J]. Theranostics, 2022, 12(1):324-339.
- [3] KIM S, KANG S W, JOO J, et al. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions[J]. Cell Death Dis, 2021,12(2):160.
- [4] STARUSCHENKO A. TRPC6 in diabetic kidney disease: Good guy or bad guy? [J]. Kidney Int, 2019,95(2):256-258.
- [5] MARKÓ L, MANNAA M, HASCHLER T N, et al. Renoprotection: Focus on TRPV1, TRPV4, TRPC6 and TRPM2[J]. Acta Physiol (Oxf), 2017,219(3):589-612. (下转第 388 页)

J Hematol Oncol, 2019,12(1):34.

- [20] QIU S Q, ZHONG X Y, MENG X, et al. Mitochondria-localized cGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression[J]. Cell Res, 2023,33(4):299-311.
- [21] ZHAO L, ZHOU X X, XIE F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy[J]. Cancer Commun, 2022,42(2):88-116.
- [22] LU Y, JIANG Z T, WANG K J, et al. Blockade of the amino acid transporter SLC6A14 suppresses tumor growth in colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2022,22(1):833.
- [23] WU M M, ZHANG X, ZHANG W J, et al. Cancer stem cell regulated phenotypic plasticity protects metastasized cancer cells from ferroptosis[J]. Nat Commun, 2022,13(1):1371.
- [24] SAHA S K, CHOI H Y, KIM B W, et al. KRT19 directly interacts with β -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties[J]. Oncogene, 2017,36(3):332-349.
- [25] WANG J, HU T, WANG Q, et al. Repression of the AURKA-CXCL5 axis induces autophagic cell death and promotes radiosensitivity in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2021,509:89-104.
- [26] LIU S, SHI J Z, WANG L W, et al. Loss of EMP1 promotes the metastasis of human bladder cancer cells by promoting migration and conferring resistance to ferroptosis through activation of PPAR gamma signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2022,189:42-57.
- [27] MA S, LU C C, YANG L Y, et al. ANXA2 promotes esophageal cancer progression by activating MYC-HIF1A-VEGF axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018,37(1):183.
- [28] ZHANG S X, XU Y R, XIE C, et al. RNF219/ α -catenin/LGALS3 axis promotes hepatocellular carcinoma bone metastasis and associated skeletal complications[J]. Adv Sci, 2021,8(16):e2102956.
- (本文编辑 范睿心 厉建强)
-
- (上接第 382 页)
- [6] FU Y Q, WANG C X, ZHANG D M, et al. Increased TRPC6 expression is associated with tubular epithelial cell proliferation and inflammation in diabetic nephropathy[J]. Mol Immunol, 2018,94:75-81.
- [7] LIN B L, MATERA D, DOERNER J F, et al. *In vivo* selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019,116(20):10156-10161.
- [8] HOU X, XIAO H T, ZHANG Y H, et al. Transient receptor potential channel 6 knockdown prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation[J]. Cell Death Dis, 2018,9(10):1015.
- [9] GREEN D R, GALLUZZI L, KROEMER G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging[J]. Science, 2011,333(6046):1109-1112.
- [10] SAXENA S, MATHUR A, KAKKAR P. Critical role of mitochondrial dysfunction and impaired mitophagy in diabetic nephropathy[J]. J Cell Physiol, 2019,234(11):19223-19236.
- [11] LI C R, LI L, YANG M, et al. PACS-2 ameliorates tubular injury by facilitating endoplasmic reticulum-mitochondria contact and mitophagy in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2022,71(5):1034-1050.
- [12] DONG Y, ZHANG Q Z, WEN J J, et al. Ischemic duration and frequency determines AKI-to-CKD progression monitored by dynamic changes of tubular biomarkers in IRI mice[J]. Front Physiol, 2019,10:153.
- [13] CHANG J S, YAN J Y, LI X L, et al. Update on the mechanisms of tubular cell injury in diabetic kidney disease[J]. Front Med, 2021,8:661076.
- [14] DOKE T, SUSZTAK K. The multifaceted role of kidney tubule mitochondrial dysfunction in kidney disease development [J]. Trends Cell Biol, 2022,32(10):841-853.
- [15] CHUNG K W, DHILLON P, HUANG S Z, et al. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis[J]. Cell Metab, 2019,30(4):784-799.e5.
- [16] HAN Y C, XU X X, TANG C Y, et al. Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis[J]. Redox Biol, 2018,16:32-46.
- [17] LIU L, BAI F, SONG H, et al. Upregulation of TIPE1 in tubular epithelial cell aggravates diabetic nephropathy by disrupting PHB2 mediated mitophagy [J]. Redox Biol, 2022,50:102260.
- [18] HALL G, WANG L M, SPURNEY R F. TRPC channels in proteinuric kidney diseases[J]. Cells, 2019,9(1):44.
- [19] SZREJDER M, RACHUBIK P, ROGACKA D, et al. Metformin reduces TRPC6 expression through AMPK activation and modulates cytoskeleton dynamics in podocytes under diabetic conditions [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020,1866(3):165610.
- [20] ILATOVSKAYA D V, BLASS G, PALYGIN O, et al. A NOX4/TRPC6 pathway in podocyte calcium regulation and renal damage in diabetic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2018,29(7):1917-1927.
- [21] YAO X M, GUO H J, SUN M Y, et al. Klotho ameliorates podocyte injury through targeting TRPC6 channel in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2022,2022:1329380.
- [22] ZHOU Y, LI Z L, DING L, et al. Long noncoding RNA SNHG5 promotes podocyte injury via the microRNA-26a-5p/TRPC6 pathway in diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2022,298(12):102605.
- (本文编辑 范睿心 厉建强)