

瞬时感受电位通道6在同型半胱氨酸诱导的小鼠肾脏足细胞自噬中的作用

卢冠军^{1,2}, 汪乐新^{1,2,3}, 赵静^{1,2}, 刘超^{1,2,3}, 熊建团^{1,2,3}, 焦运^{2,3}, 杨安宁^{2,3}, 姜怡邓^{2,3}, 田宇佳², 徐遥琴², 石青², 刘莉², 张亚兰⁴, 白志刚⁵, 李淑娟^{2,6*}

¹宁夏医科大学总医院泌尿外科, 宁夏银川 750004; ²宁夏医科大学第一临床医学院, 宁夏银川 750004; ³国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏银川 750004; ⁴绍兴复康护理院, 浙江绍兴 312000; ⁵宁夏回族自治区人民医院检验科, 宁夏银川 750004; ⁶宁夏医科大学总医院急诊科, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R692 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0248.2024.0721
[声明] 本文所有作者声明无利益冲突
[引用本文] 卢冠军, 汪乐新, 赵静, 等. 瞬时感受电位通道6在同型半胱氨酸诱导的小鼠肾脏足细胞自噬中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(12): 1400-1407.
[收稿日期] 2023-02-15 [录用日期] 2023-10-20 [上线日期] 2024-07-21

[摘要] 目的 探讨在同型半胱氨酸(Hcy)作用下瞬时感受电位通道6(TRPC6)对小鼠肾脏足细胞自噬的调控作用。方法 将小鼠肾脏足细胞分为对照组与Hcy组(40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 的Hcy刺激48 h), 采用qRT-PCR检测TRPC6 mRNA水平, 筛选出Hcy的最佳浓度后, 后续均以此浓度进行实验。采用Western blotting检测自噬相关蛋白LC3 II、p62, 以及足细胞结构蛋白Nephrin、Podocin的表达水平; 采用qRT-PCR、Western blotting及免疫荧光检测两组TRPC6 mRNA及蛋白的表达水平。转染过表达或干扰TRPC6的细胞分别设置为: (1)对照组(不做处理)、TRPC6过表达阴性对照组、TRPC6过表达组; (2)对照组(不做处理)、TRPC6干扰阴性对照组和TRPC6干扰组(si-1、si-2、si-3), 并采用qRT-PCR检测TRPC6表达水平。再将过表达或干扰TRPC6后的细胞分别设置为: (1)对照组(不做处理)、Hcy组(加入80 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、TRPC6过表达对照+Hcy组、TRPC6过表达+Hcy组; (2)对照组(不做处理)、Hcy组、TRPC6干扰对照+Hcy组、TRPC6干扰+Hcy组, 并采用Western blotting检测p62、LC3 II、TRPC6蛋白的表达水平。结果 qRT-PCR检测结果显示, 与对照组比较, TRPC6 mRNA表达水平随Hcy浓度增加而升高, 其中80 $\mu\text{mol/L}$ Hcy干预后的表达水平最高, 因此将80 $\mu\text{mol/L}$ 作为Hcy的最佳干预浓度。此时, 自噬相关蛋白LC3 II的表达水平升高、p62表达水平降低($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组中足细胞相关蛋白Nephrin、Podocin的表达水平明显降低($P<0.05$)。qRT-PCR检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组中TRPC6 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$); 与TRPC6过表达阴性对照组比较, TRPC6过表达组的TRPC6 mRNA及蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$); 与TRPC6干扰阴性对照组比较, TRPC6干扰组的TRPC6 mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, 与TRPC6过表达对照组相比, TRPC6过表达+Hcy组中自噬相关蛋白LC3 II表达水平明显升高, p62表达水平明显降低($P<0.05$); 与TRPC6干扰对照+Hcy组相比, TRPC6干扰+Hcy组中自噬相关蛋白LC3 II表达水平明显降低, p62表达水平明显升高($P<0.05$)。结论 Hcy可诱导小鼠肾脏足细胞自噬, 抑制TRPC6的表达可明显减轻足细胞的自噬性损伤。

[关键词] 足细胞自噬; 同型半胱氨酸; 瞬时感受电位通道6

Role of transient receptor potential channel 6 in homocysteine-induced podocyte autophagy of mouse kidney

Lu Guan-Jun^{1,2}, Wang Le-Xin^{1,2,3}, Zhao Jing^{1,2}, Liu Chao^{1,2,3}, Xiong Jian-Tuan^{1,2,3}, Jiao Yun^{2,3}, Yang An-Ning^{2,3}, Jiang Yi-Deng^{2,3}, Tian Yu-Jia², Xu Yao-Qin², Shi Qing², Liu Li², Zhang Ya-Lan⁴, Bai Zhi-Gang⁵, Li Shu-Juan^{2,6*}

¹Department of Urology, ²Department of Emergency, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

[基金项目] 国家自然科学基金(82060139, 81900273); 宁夏回族自治区重点研发计划(2020BFH02003, 2021BEG02033, 2020BFH02001); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2019PT330002)

[作者简介] 卢冠军, 硕士研究生, 主任医师, 主要从事慢性肾脏病方面的研究

[通信作者] 李淑娟, E-mail: 18795085256@163.com

²The First Clinical Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

³Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research, National Health Commission, Yinchuan, Ningxia 750004, China

⁴Shaoxing Rehabilitation Nursing Home, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

⁵Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia 750004, China

*Corresponding author, E-mail: 18795085256@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060139, 81900273), the Key Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2020BFH02003, 2021BEG02033, 2020BFH02001), and the Basic Research Funding Project of Central Public Welfare Research Institutes, Chinese Academy of Medical Sciences (2019PT330002)

[Abstract] Objective To explore the regulatory role of transient receptor potential channel 6 (TRPC6) on podocyte autophagy under the influence of homocysteine (Hcy) in mouse kidney. **Methods** Mouse renal podocytes were divided into control group and Hcy groups (stimulated by Hcy at 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h). The level of TRPC6 mRNA was assessed using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) to identify the optimal Hcy concentration for subsequent experiments. Western blotting was employed to evaluate the expression levels of autophagy-related proteins LC3 II and p62, as well as the expression levels of podocyte structural proteins Nephhrin and Podocin. The expression levels of TRPC6 mRNA and protein in both groups were determined using qRT-PCR, Western blotting and immunofluorescence. Transfections of cells with TRPC6 overexpression or interference were set as follows: (1) control group (untreated), negative control group of TRPC6 overexpression, and TRPC6 overexpression group; (2) control group (untreated), negative control group of TRPC6 interference, and TRPC6 interference group (si-1, si-2, si-3). The expression level of TRPC6 was detected using qRT-PCR. The cells after overexpressing or interfering of TRPC6 were further set as follows: (1) control group (untreated), Hcy group (80 $\mu\text{mol/L}$ Hcy added), TRPC6 overexpression control+Hcy group, TRPC6 overexpression+Hcy group; (2) control group (untreated), Hcy group, TRPC6 interference control+Hcy group, and TRPC6 interference+Hcy group. The expression levels of p62, LC3 II, and TRPC6 proteins were detected using Western blotting. **Results** qRT-PCR detection results showed that compared with control group, the expression level of TRPC6 mRNA in Hcy group increased with the increase of Hcy concentration, with the highest expression level observed at 80 $\mu\text{mol/L}$ Hcy. Therefore, 80 $\mu\text{mol/L}$ Hcy was selected as the optimal concentration for intervention. At this time, the expression level of autophagy-related protein LC3 II increased, and the expression level of p62 decreased ($P < 0.05$). Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of podocyte-related proteins Nephhrin and Podocin in Hcy group were significantly decreased ($P < 0.05$). qRT-PCR results showed that compared with control group, the expression level of TRPC6 mRNA in Hcy group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with negative control group for TRPC6 overexpression, both mRNA and protein expression levels of TRPC6 in TRPC6 overexpression group were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with negative control group for TRPC6 interference, both mRNA and protein expression levels of TRPC6 in TRPC6 interference group were significantly decreased ($P < 0.05$). Western blotting results showed that compared with negative control group for TRPC6 overexpression, the expression level of autophagy-related protein LC3 II in TRPC6 overexpression+Hcy group was significantly increased, and the expression level of p62 was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with TRPC6 negative control+Hcy group for TRPC6 interference+Hcy, the expression level of autophagy-related protein LC3 II in TRPC6 interference+Hcy group was significantly decreased, and the expression level of p62 was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Hcy can induce autophagy of renal podocytes. Inhibiting the expression of TRPC6 can significantly reduce the autophagy damage to podocytes.

[Key words] podocyte autophagy; homocysteine; transient receptor potential channel 6

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是甲硫氨酸循环中的代谢产物^[1]。目前,慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)已成为危害健康的一大杀手^[2-4]。相关研究显示,CKD患者占全球人口的10%~13%,而我国CKD总患病率为10.8%,估计有1.195亿CKD患者,而高同型半胱氨酸(hyperhomo-cysteinemia, HHcy)是CKD的诱发因素^[5-8]。瞬时感受电位通道6(transient receptor potential channel 6, TRPC6)是一种非选择性 Ca^{2+} 通道,对调节肾脏生理平衡起着关键作用,如近端小管经 $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交换体重吸收 Ca^{2+} ,或经细胞旁途径吸收 Ca^{2+} ^[9-10]。有研究发现,TRPC6通道

异常开放可增加致病风险,且其在多种疾病中表达异常^[10]。如Jain等^[11]发现,TRPC6通道大量激活可使肺动脉压增高,导致疾病的发生发展;揭育祯等^[12]发现,在胰岛 β 细胞发生细胞焦亡的过程中,TRPC6高表达与疾病的发生发展呈正相关,而TRPC6通道异常激活后则通过DNA甲基化的方式损伤胰岛 β 细胞,最终导致疾病的发生。目前越来越多的学者关注到TRPC6异常表达是影响疾病发展的关键因素之一,但其在Hcy诱导CKD中的作用鲜有报道^[13]。本研究探讨TRPC6对Hcy诱导的足细胞自噬中的调控作用,旨在为深入研究CKD的发生发展

提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司；蛋白提取试剂盒购自上海凯基生物技术有限公司；总RNA提取试剂盒购自日本宝日生物技术有限公司；反转录试剂盒、荧光PCR试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。小鼠肾脏足细胞株(MPC-5)购自深圳豪地华拓生物科技有限公司；TRPC6干扰片段及过表达质粒购自上海吉玛制药技术有限公司。LSM 510 SYSTEM激光共聚焦显微镜购自德国ZEISS公司；电泳仪、电转仪、Model680全自动酶标仪购自美国Bio-Rad公司；超净工作台购自中国苏州安泰有限公司；CO₂培养箱和5415D型微量台式离心机购自美国Eppendorf公司；BS110S型精密天平购自美国Sar-Torion公司；荧光定量PCR仪购自上海枫岭生物技术有限公司；制冰机购自美国Scotsman公司。

1.2 细胞模型建立 用含有10%胎牛血清的DMEM培养液培养肾脏足细胞MPC-5，置于37℃、5%CO₂培养箱中，2d传代一次，取对数生长期(第3~4代)细胞用于实验。

1.3 实验分组及处理 (1)将细胞分为对照组及Hcy组，其中Hcy组浓度分别设置为0、40、60、80、100 μmol/L干预48 h，采用qRT-PCR检测TRPC6 mRNA水平，以筛选最佳浓度，后续均以此浓度进行实验。采用Western blotting检测两组LC3 II、P62自噬相关蛋白的表达水平，以及足细胞结构蛋白Nephrin、podocin的表达水平；采用qRT-PCR、Western blotting及免疫荧光检测两组TRPC6 mRNA及蛋白的表达水平。(2)将转染过表达或干扰TRPC6的细胞分别设置为：①对照组(不做处理)、TRPC6过表达阴性对照组、TRPC6过表达组；②对照组(不做处理)、TRPC6干扰阴性对照组和TRPC6干扰组(si-1、si-2、si-3)，并采用qRT-PCR检测过表达或干扰TRPC6后的足细胞TRPC6表达水平。(3)再将过表达或干扰TRPC6后的细胞分别设置为：①对照组(不做处理)、Hcy组(加入80 μmol/L Hcy)、TRPC6过表达对照+Hcy组、TRPC6过表达+Hcy组；②对照组(不做处理)、Hcy组、TRPC6干扰对照+Hcy组、TRPC6干扰+Hcy组，并采用Western blotting检测过表达或干扰TRPC6后的足细胞P62、LC3 II、TRPC6蛋白的表达水平。

1.4 细胞转染 根据Lipofectamine™ 2000说明书将Ad-TRPC6及si-TRPC6转染至肾脏足细胞中。转染前1 d，在250 μl的DMEM培养基中接种2×10⁵个细胞。A液：250 μl DMEM纯培养基分别与Ad-TRPC6、si-

TRPC6 5 μl混合，吹打2~3次混匀。B液：250 μl DMEM纯培养基与6 μl Lipofectamine™ 2000混合，吹打2~3次混匀，静置5 min。A液加B液吹打2~3次混匀，室温下静置20 min。补充3.5 ml纯培养基混匀，将培养瓶置于37℃、5%CO₂培养箱培养6~8 h，Hcy干预48 h后收取细胞，以便进行后续实验。

1.5 qRT-PCR检测TRPC6 mRNA的表达水平 采用总RNA试剂盒提取小鼠肾脏足细胞的总RNA，通过NCBI查询TRPC6的ID序列号，经GeneBank查询上下游引物序列，引物由上海生物生工公司合成。TRPC6引物，上游：5'-CTGATCCTCAGATCATCTCT-3'，下游：5'-GAGTAAAGGTTGAACATTCC-3'；GAPDH引物，上游：5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'，下游：5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'。反转录反应体系：Prime Script buffer for Real Time 2 μl、Oligo Diprimer 1 μl、Random 1 μl、Prime Script RT Enzyme Mix 1 μl、H₂O与RNA总体积之和为13 μl；PCR反应体系：TB Green 10 μl、上下游引物各0.8 μl、H₂O 6.4 μl、反转录产物2 μl。qRT-PCR扩增反应，共45个循环。以小鼠GAPDH为内参照，目的基因扩增后通过2^{-ΔΔCt}计算目的基因相对表达量。

1.6 Western blotting检测TRPC6、Nephrin、Podocin、LC3 II、p62蛋白表达水平 收集小鼠肾脏足细胞，5000 r/min离心5 min后弃上清，根据凯基试剂盒说明书提取总蛋白，BCA法测定蛋白浓度，加200 μl蛋白上样缓冲液，金属浴99℃煮沸5 min变性，配制8%、10% SDS-PAGE凝胶，经SDS-PAGE凝胶电泳80 V、20 min，120 V、40 min，湿转2 h后转移至PVDF膜上，5%脱脂奶粉封闭2 h，加入1:1000稀释的TRPC6、Nephrin、Podocin、LC3 II及p62兔一抗4℃孵育过夜。PBST洗膜10 min×3次，用1:5000稀释的兔HRP二抗(ZB-2301,购自北京中杉金桥生物技术有限公司)孵育2 h，PBST洗膜10 min×3次。采用Image Lab软件扫描并采集图像，以β-actin为内参照，计算TRPC6、Nephrin、Podocin、LC3 II、p62的相对表达量。

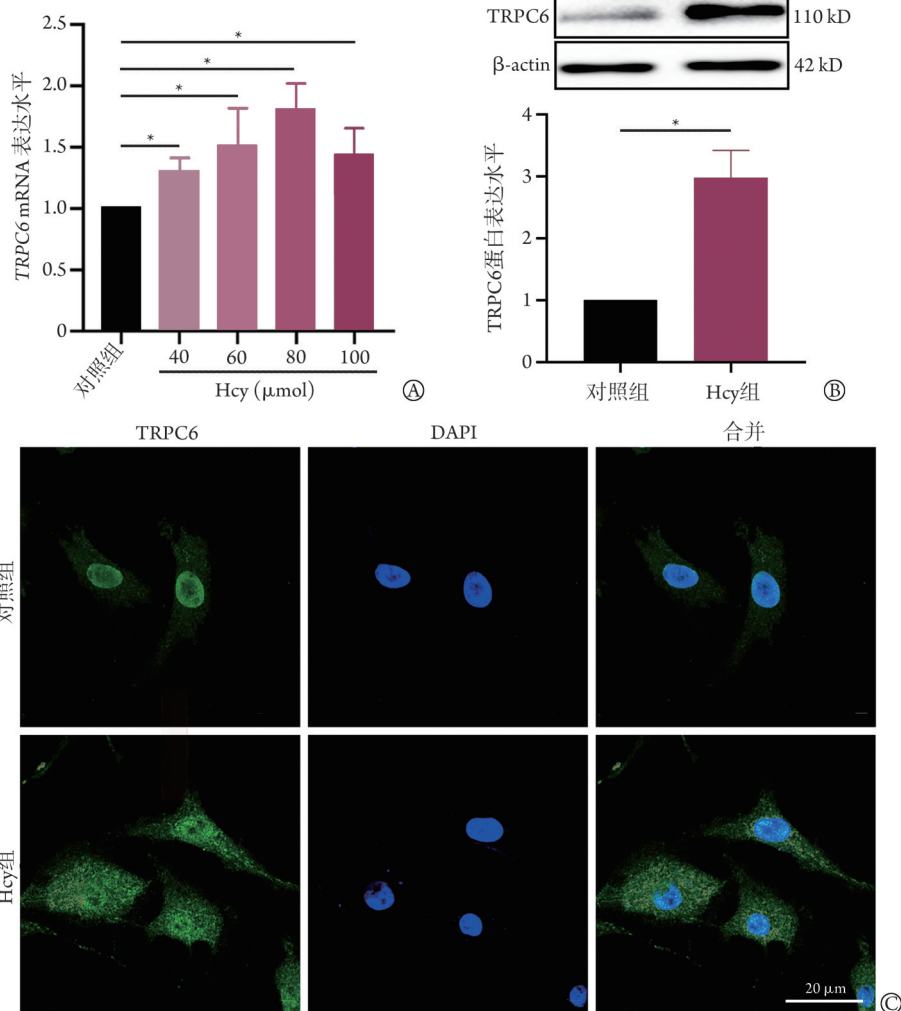
1.7 免疫荧光染色检测TRPC6蛋白的表达情况 将传代时生长状态良好的肾脏足细胞以70%的密度铺到共聚焦小皿中，Hcy干预48 h后收集细胞。PBS洗5 min×3次，4%多聚甲醛溶液固定30 min，PBS洗5 min×3次；0.2% Triton X-100溶液通透20 min，PBS洗5 min×3次；山羊血清覆盖封闭30 min，按照说明书配制一抗，置于4℃暗盒中孵育过夜。隔天取出小皿用PBS洗5 min×3次，加入荧光二抗，37℃避光孵育1 h，PBS洗5 min×3次；滴加DAPI液，避光孵育5 min，PBS洗5 min×3次，滴入适量封片淬灭剂后用LSM 510 SYSTEM激光共聚焦显微镜采集图像。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况 胰酶消化收集小鼠肾脏足细胞，制备细胞悬液，PBS洗5 min×2次；12 000 r/min离心5 min，用500 μl Annexin V结合细胞悬液，加入5 μl Annexin V-FITC和PI染色并标记单染管、双染管、空白管，在单染管仅加PI，双染管加Annexin V-FITC和PI，空白对照组管不加，静置20 min后上机检测足细胞凋亡率。

1.9 统计学处理 采用Prism 8.0软件进行统计分析。实验数据均为计量资料且符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用t检验；多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy诱导的TRPC6表达情况 qRT-PCR检测结果显示，与对照组比较，40、60、80 μmol/L Hcy组TRPC6 mRNA表达水平逐渐升高，但Hcy浓度达到100 μmol/L时，TRPC6 mRNA表达水平反而降低，因此，后续实验选择80 μmol/L作为最佳干预浓度(图1A)。Western blotting检测结果显示，与对照组比较，Hcy组TRPC6蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ ，图1B)。免疫荧光染色结果显示，与对照组比较，Hcy组TRPC6的免疫荧光表达强度明显增强($P < 0.05$ ，图1C)。



Hcy. 同型半胱氨酸; TRPC6. 瞬时感受电位通道6; A. 最佳Hcy干预浓度的筛选; B. Western blotting检测TRPC6蛋白表达水平; C. Hcy干预后足细胞TRPC6的免疫荧光强度; * $P < 0.05$

图1 Hcy促进激活瞬时感受电位通道6的表达

Fig.1 Homocysteine promotes the expression of transient receptor potential channel 6

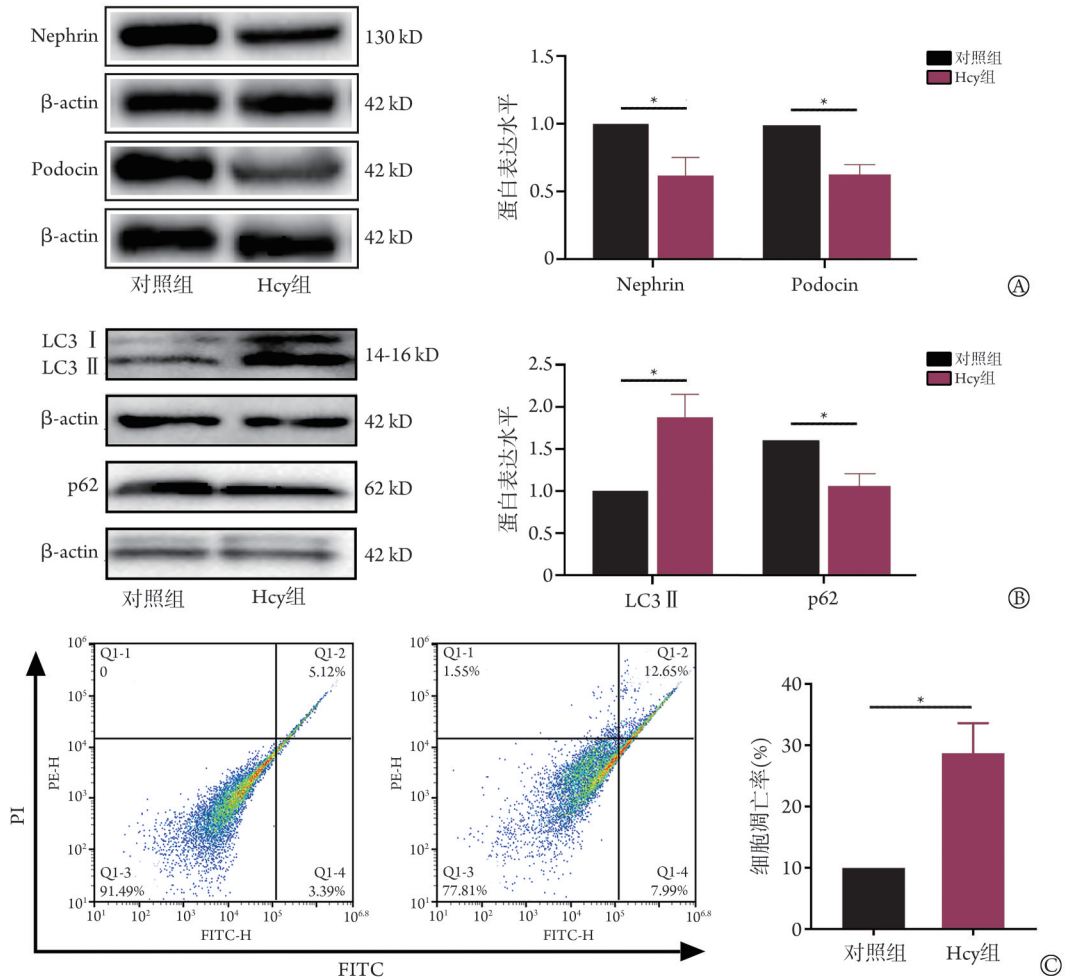
2.2 Hcy诱导自噬对肾脏足细胞的影响 Western blotting检测结果显示，与对照组比较，Hcy组中Nephrin、Podocin蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$ ，图2A)，LC3 II、p62蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ ，

图2B)。流式细胞术检测结果显示，与对照组比较，Hcy组细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$ ，图2C)。

2.3 TRPC6过表达及干扰后TRPC6 mRNA的表达水平 qRT-PCR检测结果显示，对照组与TRPC6过表

达阴性对照组的 *TRPC6* mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示转染成功; 与 *TRPC6* 过表达阴性对照组比较, *TRPC6* 过表达组 *TRPC6* mRNA 表达水平明显增高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图 3A)。对照组与 *TRPC6* 干扰阴性对照组的 *TRPC6*

mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示转染成功; 与 *TRPC6* 干扰阴性对照组比较, *TRPC6* 干扰组 (si-1、si-2、si-3) *TRPC6* mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$, 图 3B), 且 si-1 干扰效果最强, 据此选择 si-1 干扰片段用于后续实验。



Hcy. 同型半胱氨酸; A. Hcy 干预后足细胞 Nephrin、Podocin 蛋白的表达; B. Hcy 干预后足细胞自噬相关蛋白 LC3 II、p62 的表达; C. 细胞流式术检测两组细胞的凋亡率; * $P<0.05$

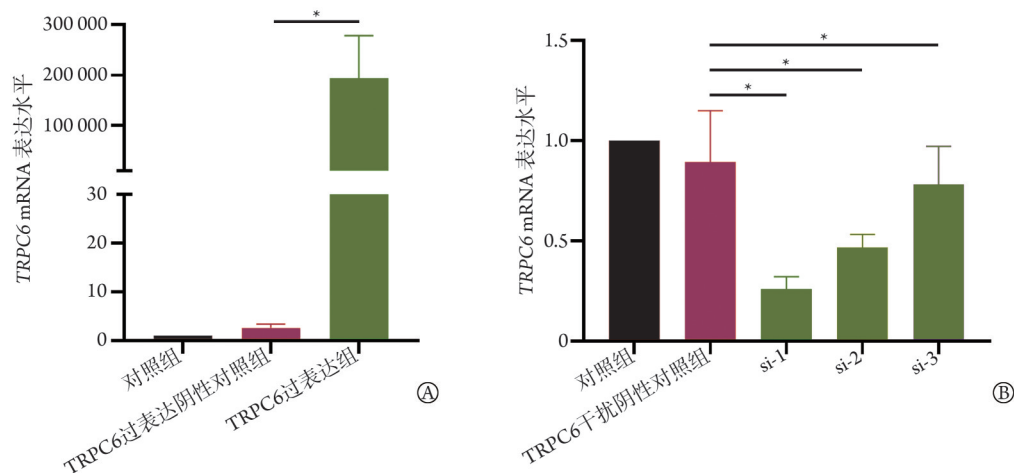
图2 Hcy 诱导自噬对肾脏足细胞的影响

Fig.2 Effect of autophagy induced by homocysteine (Hcy) on podocyte cell

2.4 TRPC6 过表达及干扰后 TRPC6 蛋白的表达水平 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, Hcy 组、TRPC6 过表达对照+Hcy 组及 TRPC6 过表达+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 TRPC6 过表达对照+Hcy 组比较, TRPC6 过表达+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$); 而 Hcy 组与 TRPC6 过表达对照+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 4A)。与对照组比较, Hcy 组及 TRPC6 干扰对照+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), 而 TRPC6 干扰+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 TRPC6 干扰对照+Hcy 组比较, TRPC6 干扰+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$);

而 Hcy 组与 TRPC6 干扰对照+Hcy 组 TRPC6 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 4B)。

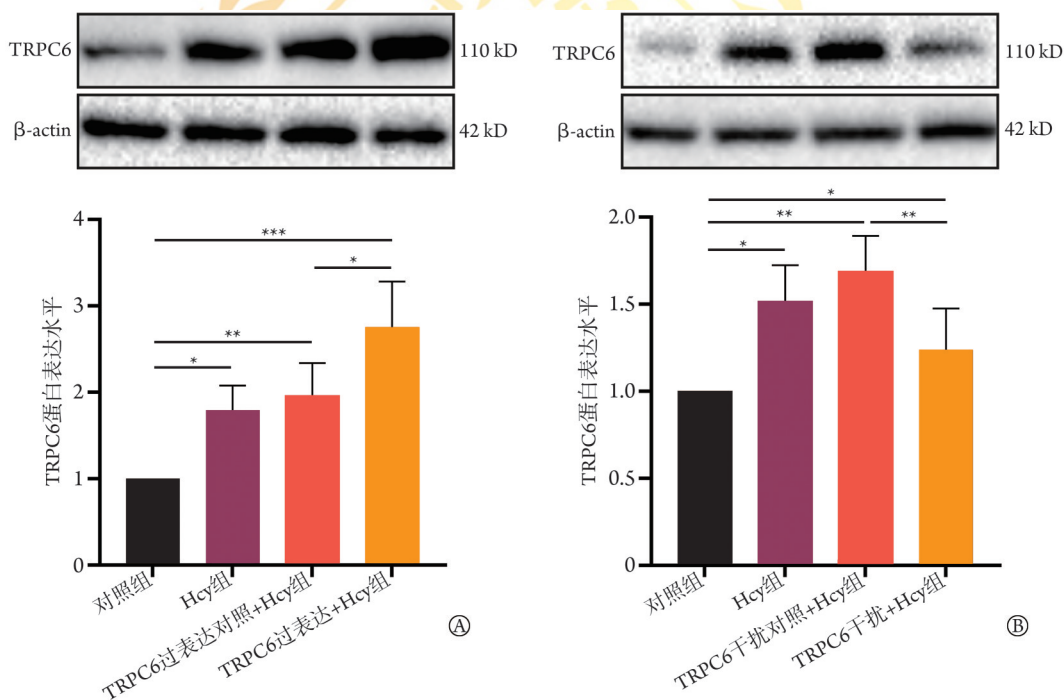
2.5 过表达及干扰 TRPC6 后自噬相关蛋白 p62、LC3 II 的表达情况 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, Hcy 组、TRPC6 过表达对照+Hcy 组、TRPC6 过表达+Hcy 组中 LC3 II 蛋白表达水平明显升高, p62 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 TRPC6 过表达对照+Hcy 组比较, TRPC6 过表达+Hcy 组 LC3 II 蛋白表达水平明显升高, p62 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 而 Hcy 组与 TRPC6 过表达对照+Hcy 组 LC3 II、p62 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 5A)。与对照组比较, Hcy 组、TRPC6 干扰对照+Hcy 组及 TRPC6 干扰+Hcy 组中



TRPC6. 瞬时感受电位通道6; A. TRPC6过表达后 TRPC6 mRNA 的表达水平; B. TRPC6干扰后 TRPC6 mRNA 的表达水平; * $P < 0.05$

图3 TRPC6过表达或干扰后各组 TRPC6 mRNA 表达水平的比较

Fig.3 Comparison of TRPC6 mRNA expression levels among groups after TRPC6 overexpression or interference



TRPC6. 瞬时感受电位通道6; Hcy. 同型半胱氨酸; A. TRPC6过表达后 TRPC6蛋白的表达水平; B. TRPC6干扰后 TRPC6蛋白的表达水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图4 过表达及干扰 TRPC6后 TRPC6蛋白表达水平的变化

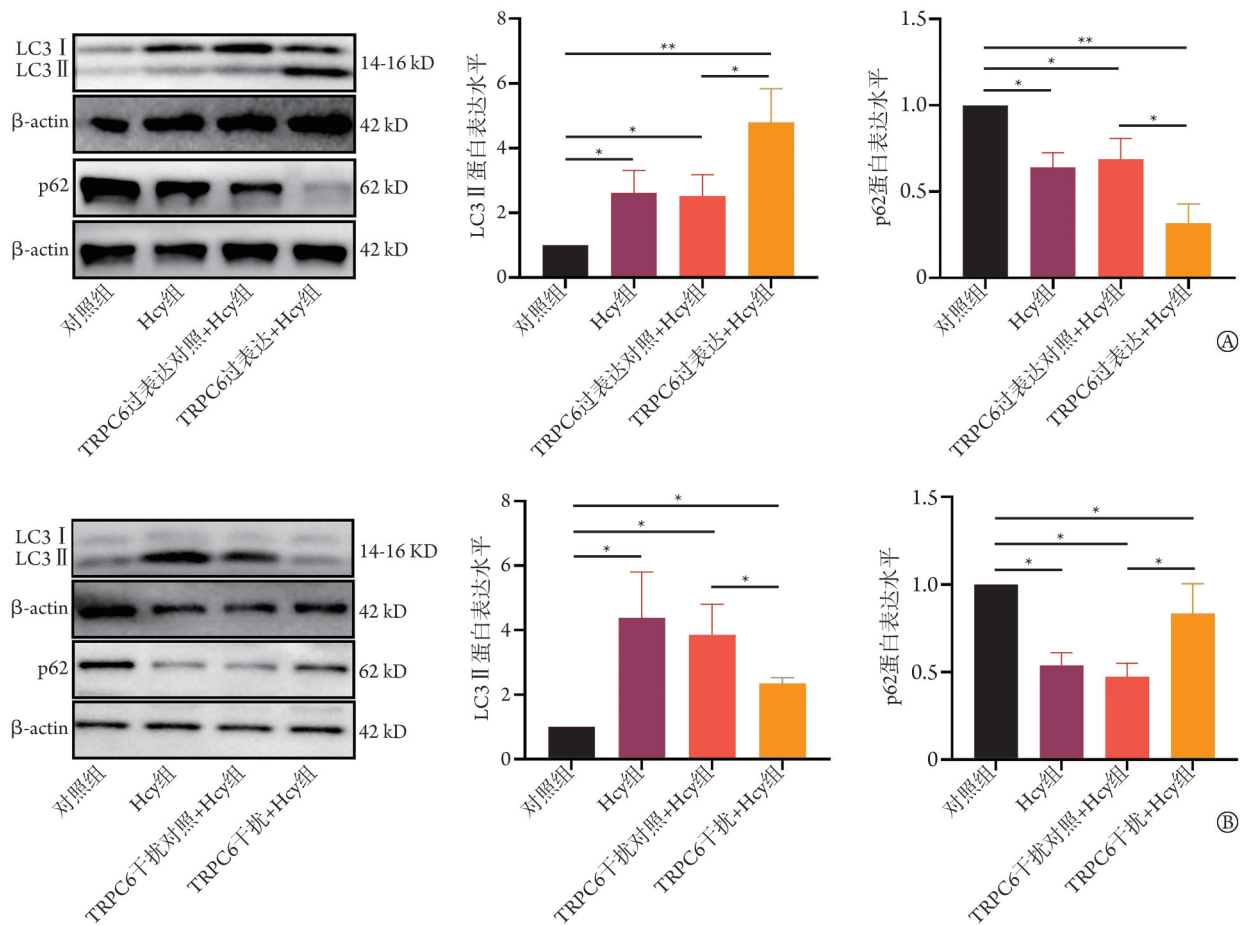
Fig.4 Changes of protein expression of TRPC6 after overexpression and interference with TRPC6

LC3 II蛋白表达水平明显升高, p62蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$); 与 TRPC6 干扰对照+Hcy 组比较, TRPC6 干扰+Hcy 组 LC3 II 蛋白表达水平明显降低, p62 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 而 Hcy 组与 TRPC6 干扰对照+Hcy 组 LC3 II、p62 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 5B)。

3 讨 论

肾脏足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分,

位于肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)最外侧。足细胞损伤可使肾小球滤过率降低,是导致 CKD 的因素之一^[14]。细胞自噬是以胞内吞噬降解为特点的一种程序性死亡方式;在生理状态下细胞自噬活性通常较低,但在病理状态下,细胞自噬明显增强。自噬作为一种防御机制,溶酶体降解是其重要途径之一。当机体出现衰老或蛋白质功能紊乱时,胞内溶酶体大量被激活、释放,吞噬衰老及功能异常的细胞,在人体内环境稳态中发挥重要



TRPC6. 瞬时感受电位通道6; Hcy. 同型半胱氨酸; A. TRPC6过表达后自噬相关蛋白的表达水平; B. TRPC6干扰后自噬相关蛋白的表达水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 过表达或干扰TRPC6后自噬相关蛋白的表达变化

Fig.5 Changes of autophagy-related protein expression after overexpression or interference with TRPC

作用^[15-16]。

多项研究证实了Hcy在CKD进展中的作用及其与细胞自噬的关系^[17-19]。细胞自噬的特点是胞内物质的吞噬和降解,已被证实与多种疾病的发展密切相关^[20-23]。本研究发现,Hcy可使足细胞结构蛋白Podocin和Nephrin的表达水平降低,并诱导足细胞自噬,表现为自噬相关蛋白LC3 II表达水平升高,以及p62蛋白表达水平降低。以上结果提示,Hcy可通过上调自噬水平导致肾脏损伤。

此外,吴凡等^[21]发现,Hcy能够抑制血管内皮细胞中SIRT1的表达,从而促进血管内皮细胞凋亡,而SIRT1水平升高则可减少Hcy诱导的血管内皮细胞凋亡及动脉粥样硬化斑块的形成。揭育祯等^[12]发现,Hcy可促进胰岛β细胞焦亡,而TRPC6甲基化可能是这一过程的关键。基于此,笔者推测,在CKD中TRPC6也可促进肾脏足细胞的自噬,加速CKD的进展。本研究结果证实了这一推测,提示高水平的Hcy作为损伤因子,可能通过自噬性损伤来诱导疾病的发生。

TRPC6是一种非选择性钙离子通道,属于TRPC家族,在CKD中存在异常表达^[24-29]。本研究发现,Hcy干预后TRPC6表达上调,进而引起足细胞自噬,导致肾脏损伤;干扰TRPC6的表达则可降低足细胞自噬水平,增加p62蛋白的表达,从而主动协同转运、降解自噬小体,减少LC3 I向LC3B-II的转换;相反,过表达TRPC6则会加重自噬性损伤,提示TRPC6的表达调控对于Hcy诱导的自噬水平具有明显影响,而自噬水平的改变对慢性肾损伤至关重要。由此可见,TRPC6能够调控自噬水平,减轻自噬对慢性肾损伤的影响,同时TRPC6还可作为一种新型的诊断标志物或治疗靶点,控制钙离子通道的开放和关闭,调控钙离子平衡,在慢性肾损伤的治疗中具有潜在的应用价值。

综上所述,本研究在揭示Hcy在CKD中的关键作用方面取得了重要进展,并为进一步理解自噬在疾病进展中的复杂作用机制提供了新的视角。临床上,对Hcy水平的监测可能成为早期诊断和干预CKD的有效手段,有望显著改善患者的预后。然

而,本研究也存在一定的局限性:(1)主要是基于细胞水平进行验证,缺乏动物模型的支持,这可能影响了结果的普遍性和可靠性;(2)未充分考虑遗传因素和其他潜在的调控机制,这些因素可能与Hcy和自噬在CKD中的作用。未来的研究应致力于克服这些局限,在动物模型中验证研究结果,并考虑更多的因素,以进一步深化对Hcy和TRPC6在CKD中作用机制的理解,这不仅有望为CKD的治疗带来更多希望,也可能为其他相关疾病的治疗提供新的思路和方法。

【参考文献】

- [1] 程小兵,罗娟娟,陈燕,等.小而密低密度脂蛋白胆固醇及其与低密度脂蛋白胆固醇之比、同型半胱氨酸对颈动脉粥样硬化的影响[J].实用医学杂志,2020,36(19):2684-2689.
- [2] Mende CW. Chronic kidney disease and SGLT2 inhibitors: a review of the evolving treatment landscape[J]. *Adv Ther*, 2022, 39(1): 148-164.
- [3] Xie L, Ma S, Ding N, *et al.* Homocysteine induces podocyte apoptosis by regulating miR-1929-5p expression through c-Myc, DNMT1 and EZH2[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(11): 3203-3221.
- [4] Badri S, Vahdat S, Seirafian S, *et al.* Homocysteine-lowering interventions in chronic kidney disease[J]. *J Res Pharm Pract*, 2021, 10(3): 114-124.
- [5] D'Souza SW, Glazier JD. Homocysteine metabolism in pregnancy and developmental impacts[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 802285.
- [6] Li H, Liu L, Cao Z, *et al.* Naringenin ameliorates homocysteine induced endothelial damage via the AMPK α /Sirt1 pathway[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 137-147.
- [7] Zhang S, Zhang Y, Zhang X, *et al.* Nitrate stress-related autophagic insufficiency participates in hyperhomocysteinemia-induced renal aging[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4252047.
- [8] Mu ZJ, Fu JL, Sun LN, *et al.* Associations between homocysteine, inflammatory cytokines and sarcopenia in Chinese older adults with type 2 diabetes[J]. *BMC Geriatr*, 2021, 21(1): 692.
- [9] Yang J, Tang L, Zhang F, *et al.* Sevoflurane preconditioning promotes mesenchymal stem cells to relieve myocardial ischemia/reperfusion injury via TRPC6-induced angiogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 584.
- [10] Liu L, Chen M, Lin K, *et al.* TRPC6 attenuates cortical astrocytic apoptosis and inflammation in cerebral ischemic/reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 594283.
- [11] Jain PP, Lai N, Xiong MM, *et al.* TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(6): L1161-L1182.
- [12] 揭育祯,杨慧霞,周瑜瑾,等. TRPC6 DNA甲基化在同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞焦亡中的作用研究[J].广东医学,2022,43(2): 162-168.
- [13] 't Hart D, Li J, van der Vlag J, *et al.* Repurposing riociguat to target a novel paracrine nitric oxide-TRPC6 pathway to prevent podocyte injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12485.
- [14] 闫林轩,梅霄阳,章林明,等. G蛋白偶联雌激素受体通过减轻大鼠肾小管上皮细胞凋亡保护肾脏缺血再灌注损伤[J].实用医学杂志,2021,37(10): 1235-1239.
- [15] Lin Q, Banu K, Ni Z, *et al.* Podocyte autophagy in homeostasis and disease[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(6): 1184.
- [16] 张欣,廖晓辉. 线粒体功能障碍在急性肾损伤向慢性肾脏疾病转变中的作用[J].基础医学与临床,2021,41(4): 589-592.
- [17] 吉琳梅,沈宏春,樊均明. NRF2通路在慢性肾脏疾病发生发展中的作用研究进展[J].山东医药,2016,56(19): 100-102.
- [18] Adamczak M, Surma S. Metabolic acidosis in patients with CKD: epidemiology, pathogenesis, and treatment[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2021, 7(6): 452-467.
- [19] Zheng Z, Tsvetkov D, Bartolomaeus TUP, *et al.* Role of TRPC6 in kidney damage after acute ischemic kidney injury[J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 3038.
- [20] Chang P, Li H, Hu H, *et al.* The role of HDAC6 in autophagy and NLRP3 inflammasome[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 763831.
- [21] 吴凡,金培印,王学惠. 上调SIRT1减少同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞凋亡[J].中国循证心血管医学杂志,2022,14(1): 58-61.
- [22] 卢晓燕,任钰. 不同剂量叶酸对不同MTHFR基因型缺血性脑卒中伴高同型半胱氨酸血症患者同型半胱氨酸水平的影响[J].中国医药导报,2021,18(17): 90-93.
- [23] Gonzalez CD, Carro Negueruela MP, Nicora Santamarina C, *et al.* Autophagy dysregulation in diabetic kidney disease: from pathophysiology to pharmacological interventions[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2497.
- [24] Zheng Z, Xu Y, Krügel U, *et al.* In vivo inhibition of TRPC6 by SH045 attenuates renal fibrosis in a New Zealand obese (NZO) mouse model of metabolic syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6870.
- [25] Feng Y, Li M, Wang Y, *et al.* Activation of TRPC6 by Ang II induces podocyte injury and participates in proteinuria of nephrotic syndrome[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 915153.
- [26] 邓林林,张啸,高仪,等. miR-216a调控NF- κ B信号通路参与脓毒症急性肾损伤的机制[J].实用医学杂志,2022,38(17): 2133-2137.
- [27] Ding Y, Tang X, Wang Y, *et al.* Tetrandrine alleviates podocyte injury via calcium-dependent calpain-1 signaling blockade[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 296.
- [28] Tedeschi V, Sisalli MJ, Pannaccione A, *et al.* Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform 1 (NCX1) and canonical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) are recruited by STIM1 to mediate Store-Operated Calcium Entry in primary cortical neurons[J]. *Cell Calcium*, 2022, 101: 102525.
- [29] 吴彦立,周文杰,李晓玲,等. 血清Nod样蛋白受体3、白介素-18水平与脓毒症急性肾损伤患者病情严重程度的相关性[J].实用医学杂志,2022,38(4): 484-488.

(责任编辑:张小利)