

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20240902.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240902.1639.002>

基于 miR-26a/TRPC6 轴探究六味地黄汤对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用机制

李 杨^{1,2}, 温伟波✉

(1. 云南省中医医院/云南中医药大学第一附属医院, 云南 昆明 650000; 2. 云南省妇幼保健院中医科, 云南 昆明 650000)

[摘要] **目的:** 探讨六味地黄汤改善糖尿病肾病大鼠的作用机制。 **方法:** 八周龄雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 180~220 g, 随机分为 6 组 ($n=10$), 即正常组、模型组、六味地黄汤低剂量组、六味地黄汤中剂量组、六味地黄汤高剂量组以及厄贝沙坦处理组。正常组常规饲料喂养, 联合一次性等剂量枸橼酸缓冲液腹腔注射。其余 50 只采用高脂饲养加一次性注射链脲佐菌素造模。造模成功后, 给予六味地黄汤灌胃治疗, 阳性对照使用厄贝沙坦处理。给药结束后先收集 24 h 尿液, 生化法检测尿蛋白含量; ELISA 检测空腹血糖、肌酐含量, 检测大鼠血清中炎症因子白细胞介素 6 (IL-6) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 水平。大鼠称重, 处死, 分离双肾组织, 苏木素-伊红 (H&E) 染色观察各组大鼠肾脏组织变化; qPCR 检测 miR-26a 表达水平; Western blot 和免疫组化检测肾脏组织中 TRPC6 表达。 **结果:** 与正常组比较, 模型组中空腹血糖、24 h 尿蛋白、肌酐水平明显升高, 体重降低, 肾指数升高, 炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 表达显著升高, miR-26a 表达降低, TRPC6 表达水平升高 ($P<0.05$), 模型组大鼠中肾组织损伤严重; 与模型组比较, 六味地黄汤灌胃处理后, 空腹血糖、24 h 尿蛋白、肌酐水平降低, 体重升高, 肾指数降低, 炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 表达降低, miR-26a 表达增强, TRPC6 表达受到抑制 ($P<0.05$), 大鼠肾组织损伤得到改善, 且高剂量组改善效果优于低剂量组。 **结论:** 六味地黄汤可能通过 miR-26a/TRPC6 分子轴改善大鼠糖尿病肾病。

[关键词] 糖尿病肾病; 六味地黄汤; miR-26a; TRPC6

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)03-0185-08

Renoprotective effect and mechanism of Liuwei Dihuang Decoction on diabetic nephropathy in a rat model based on miR-26a/TRPC6 axis

LI Yang^{1,2}, WEN Weibo✉

(1. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Women and Children's Hospital, Kunming 650000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Science and Technology Planning Project of the Department of Science and Technology of Yunnan Province (202101AZ070001-068)

[Author]: LI Yang, Associate Chief Physician, E-mail: 18009168530@163.com.

[Correspondence to]: WEN Weibo, E-mail: 850923441@qq.com.

Received: 2024-05-09

Revised: 2024-08-16

JHMu, 2025;31(3):185-192

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Liuwei Dihuang Decoction in improving diabetic nephropathy rats. **Methods:** A total of 60 eight-week-old male SD rats, weighing 180~220 g, were randomly divided into 6 groups ($n=10$), including the normal group, the model group, the Liuwei Dihuang Decoction low-dose group, the Liuwei Dihuang Decoction medium-dose group, the Liuwei Dihuang Decoction high-dose group, and the irbesartan treatment group. The normal group was fed with routine feed and intraperitoneal injection of an one-time citric acid buffer. The other 50 animals were fed with high-fat feed and molded with streptozotocin injection. After the successful modeling, Liuwei Dihuang Decoction was given as intragastric treat-

[基金项目] 云南省科技厅科技计划项目(202101AZ070001-068)

[作者简介] 李杨, 副主任医师, E-mail: 18009168530@163.com。

[通讯作者] 温伟波, E-mail: 850923441@qq.com。

[收稿日期] 2024-05-09

[修回日期] 2024-08-16

网络出版时间: 2024-09-03 10:47:45

ment, positive control was treated with irbesartan. After the administration, the urine was collected for 24 h and the protein content was detected by biochemical methods. The serum levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by ELISA. The rats were weighed, killed, and the renal tissues were separated. Hematoxylin-eosin staining (H&E) was used to observe the changes of renal tissues in each group. The expression level of *miR-26a* was detected by qPCR. Western blot and immunohistochemistry were used to detect TRPC6 expression in renal tissues. **Results:** Compared to the normal group, fasting blood glucose, 24 h urinary protein, and creatinine levels in the model group were significantly increased, body weight was decreased, renal index was increased, IL-6 and IL-1 β expressions were significantly increased, *miR-26a* expression was decreased, TRPC6 expression level was increased ($P<0.05$), and mesonephric tissue damage was severe in the model group. Compared to the model group, after the intragastric administration of Liuwei Dihuang Decoction, fasting blood glucose, 24 h urinary protein, and creatinine levels were decreased, body weight was increased, renal index was decreased, IL-6 and IL-1 β expressions were decreased, *miR-26a* expression was enhanced, TRPC6 expression was inhibited ($P<0.05$), and renal tissue injury was improved. The improvement effect of the high-dose group was better than that of the low-dose group. **Conclusion:** Liuwei Dihuang Decoction may improve diabetic nephropathy in rats through the molecular axis of *miR-26a*-TRPC6.

[Key words] Diabetic nephropathy; Liuwei Dihuang Decoction; *miR-26a*; TRPC6

糖尿病的患病率已达到流行病的程度,并在全球范围内持续迅速增加。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种已知的糖尿病患者微血管并发症,是一种慢性代谢紊乱高血糖引起肾脏各种细胞类型的功能障碍,最终导致进行性肾功能衰竭^[1,2]。对DN的治疗,西医尚无特效药物。中药六味地黄汤(Liuwei Dihuang Decoction, LW)已经被证实能够改善DN^[3,4]。微小RNA(micro RNA, *miRNA*)是一种功能性非编码RNA,其异常表达与DN进展有关,并且能够作为DN诊断和预后的生物标志物^[5]。研究表明,*miR-26a*在DN患者中异常表达,并且通过多种途径调控DN进展^[6]。瞬时受体电位阳离子通道蛋白6(transient receptor potential cation channel 6, TRPC6)广泛表达于肾组织。研究发现,TRPC6参与DN进展的调控^[7],并且与DN的治疗有关^[8]。相关文献显示 *TRPC6* 是 *miR-26a* 的潜在靶基因,*miR-26a*/*TRPC6*分子轴在DN中的作用已经被报道^[9]。然而,六味地黄汤是否能够通过*miR-26a*-TRPC6分子轴发挥抑制DN进展的作用有待进一步探索。本研究通过动物模型探讨六味地黄汤对DN大鼠的肾保护作用及其*miRNA*的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

八周龄雄性SD大鼠,体质量180~220 g,每组10只,共60只。大鼠购自购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SYXK(京)2022-0052。大鼠为SPF级饲养环境,环境温度设置在(22 $\pm$ 2)℃,相对湿度维持在45%~65%,每日光照时间规定12 h,保证大鼠有充足的水源及其饲料。本研究通过云南中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:DW2023-017)。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:链脲佐菌素(STZ, S0130, sigma公

司);高脂高糖饲料(D12492, RD公司);厄贝沙坦(138402-11-6, 瑞威尔生物科技);苏木素-伊红染色试剂盒(C0105S, 碧云天公司);TRPC6抗体(ab228771, Abcam公司);RNA提取试剂盒(DP419, 天根生化科技公司);逆转录试剂盒(RR037A, Takara公司);qPCR试剂盒(1725121, 伯乐);尿蛋白检测试剂盒(C035-2-1, 南京建成);肌酐检测试剂盒(BES20377BO, 上海博尔森);大鼠白细胞介素6, IL-6试剂盒(ml102828, 上海酶联);大鼠白细胞介素1 β , IL-1 β 试剂盒(ml037361, 上海酶联)。

主要仪器:光学显微镜(DM125, 日本奥林巴斯公司);超薄切片机(CM1860, 德国莱卡);血糖仪(Performa Connect, 罗氏);多功能酶标仪(A511197 00DP, 赛默飞);蛋白电泳仪/转膜仪(Mini-PROTEAN® Tetra, Trans-Blot Turbo, 伯乐);荧光定量PCR仪(CFX96 Touch, 伯乐);蛋白成像系统(Amersham Imager 600, GE)。

1.3 六味地黄汤的制备

六味地黄汤按熟地黄、茯苓、山茱萸、山药、牡丹皮、泽泻6:6:3:3:2:2配伍组成,先用药材总质量5倍量的蒸馏水将药材浸泡2 h,大火煮沸后文火煎煮30 min,收集药液;再向药渣中加入适量蒸馏水煎煮第2次,收集药液,将2次药液混匀后通过物理浓缩至生药含量为1 g/mL,根据每次灌胃量分装,4℃保存。

组方为熟地黄30 g、茯苓30 g、山茱萸15 g、山药15 g、牡丹皮10 g和泽泻10 g,该院临床推荐用量为110 g/d,则根据体表面积折算公式计算六味地黄汤中剂量=110 $\times$ 0.018 $\times$ 5=9.9 g/kg,低剂量则为4.95 g/kg,高剂量为19.8 g/kg。

1.4 模型构建及动物分组

根据已有文献对大鼠进行造模^[10]。60只大鼠分为正常组、模型组、六味地黄汤低剂量处理组(低

剂量组)、六味地黄汤低剂量处理组(中剂量组)、六味地黄汤低剂量处理组(高剂量组)、以及厄贝沙坦组,每组 10 只。模型组大鼠给予高脂高糖饲料喂养,6 周后联合空腹注射一次性链脲佐菌素(STZ, 35 mg/kg);正常组常规饲料喂养,联合一次性等剂量枸橼酸缓冲液腹腔注射,每 2 周测量大鼠体重记录。72 h 后以随机血糖 ≥ 16.7 mol/L,即为糖尿病模型建立成功。继续高脂高糖饲料喂养,代谢笼收集糖尿病大鼠 STZ 处理后 4~6 周的尿液,测定其体积和蛋白浓度,验证蛋白尿 ≥ 30 mg/24 h 为 DN。模型建立成功后,灌胃六味地黄汤或厄贝沙坦连续 6 周,每日一次,正常组和模型组给予等量蒸馏水。

1.5 样本收集

不同分组处理后,收集代谢笼中 24 h 尿液,用于检测尿蛋白含量;麻醉大鼠,尾静脉采血,检测大鼠空腹血糖含量;腹部主动脉采血,用于炎症因子以及血肌酐的检测。处死,取肾脏(双肾)分别称重记录,将右肾用 PBS 洗净吸干放 4% 多聚甲醛中固定,进行后续病理学检测;另一半用锡纸包裹放 -20°C 保存用于后续实验。

1.6 生化指标检测

大鼠尾静脉取血,罗氏血糖仪检测各组大鼠尾静脉空腹血糖浓度;收集大鼠 24 h 尿液,于 4°C , 3 000 r/min,离心 10 min,取上清液。按照制造商的说明,分别用尿蛋白试剂盒、肌酐试剂盒检测大鼠尿蛋白;腹主动脉采血,3 000 r/min,离心 15 min,分离血清,肌酐试剂盒检测大鼠肌酐水平。

1.7 大鼠血清炎症因子检测

抽取大鼠空腹尾静脉血,于 2 000 r/min,离心 15 min 后取上清液,使用 IL-6 试剂盒和 IL-1 β 试剂盒检测大鼠血清中炎症因子的水平。

1.8 苏木素-伊红(H&E)染色

肾组织用 4% 多聚甲醛固定 72 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明。石蜡包埋、切片。石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水化,苏木素染色 10 min,0.7% 盐酸乙醇分化,流水洗涤后,伊红液浸染 3 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。切片于光学显微镜下观察分析。

肾脏病理评分:0 分为无肾小管损伤;1 分为轻度损伤(受损肾小管占总肾小管 $<5\%$);2 分为轻度损伤(受损肾小管占总肾小管的 $5\%\sim 25\%$);3 分为中度损伤(受损肾小管占总肾小管的 $25\%\sim 75\%$);4 分为重度损伤(受损肾小管占总肾小管 $>5\%$),评分越高受损程度越严重。

1.9 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR)

使用 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA。

测定 RNA 浓度,一步法逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。然后进行定量 PCR 反应,反应体系为: H_2O 7 μL , SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , cDNA 2 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 总体积共 20 μL 。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 10 min, 然后 3 步反应, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 70°C 延伸 10 s, 共 45 个循环。

引物: miR-26a (F: 5'-CCGGGACCCAGTTCAAGTAA-3', R: 5'-CCCCGAGCCAAGTAATGGAG-3'); U6 (F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC A-3', R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'); TRPC6 (F: 5'-TCTGTGCCACAGATGTGAAG-3', R: 5'-AGCGTGTGAGGCGGTAGTAG-3'); GAPDH (F: 5'-GCAAGTTCAACGGCAGACAG-3', R: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3')。

1.10 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)

实验结束后取肾组织检测 TRPC6 蛋白表达。提取大鼠肾皮质蛋白,BCA 试剂盒测细胞总蛋白浓度,根据配方配制 10% 的分离胶 20 mL,浓缩胶入电泳槽中,加入电泳液,上样 30 μg 蛋白,加入 marker 后开始电泳;转膜:用甲醇溶液激发待用 PVDF 膜 15 s 后和滤纸均放入 transfer 中浸泡备用,按顺序铺放海绵垫-滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫,放置转膜槽内,倒入预冷的转膜缓冲液,放入冰袋,电流 300 mA, 4°C , 1.5 h;封闭:用镊子夹取 PVDF 膜于 TBST 洗 5 min,倒掉 TBST,加入 5% 的脱脂奶粉充分覆盖条带,室温慢速下摇床封闭 2 h;一抗孵育:弃掉封闭液,加入抗体稀释液配制的一抗 TRPC6 (稀释比例 1:1 000),置于 4°C 恒温摇床孵育过夜;二抗孵育:加入适量 TBST 清洗 PVDF 膜,每次 20 min,一共 3 次,加入抗体稀释液配制的二抗(稀释比例 1:10 000),室温摇床孵育 1.5 h;曝光:加入适量 TBST 清洗 PVDF, 15 min $\times$ 4 次后,按照 1:1 比例配制发光液, PVDF 膜放置玻璃板上,加 200 μL 发光液,自动曝光,保存条带图片。

1.11 免疫组化

取石蜡切片,常规脱蜡至水。3% H_2O_2 于室温下孵育 10 min,清除内源性过氧化酶;PBS 冲洗 3 次,山羊血清封闭;滴加一抗 TRPC6 (1:100), 37°C 孵育 1 h;PBS 洗 3 次;滴加二抗, 37°C 孵育 30 min;PBS 洗 3 次,加 SABC, 37°C 孵育 30 min;PBS 洗 3 次,DAB 对切片室温显色;苏木素复染;乙醇梯度脱水,二甲苯透明;中性树脂胶封片,镜下观察,拍照。

免疫组化半定量评分标准: $<10\%$ 染色的细胞为阴性染色,1 分; $10\%\sim 49\%$ 染色的细胞评分为 2; $50\%\sim 74\%$ 染色的细胞评分为 3; $75\%\sim 100\%$ 染色

的细胞评分为4。染色颜色评分为浅黄色颗粒(1)、棕黄色颗粒(2)、棕色颗粒(3)。最终评分为染色数评分乘以染色颜色评分^[11]。

1.12 统计学分析

实验所得结果用SPSS 20.0进行分析,多组比较和两组间比较分别采用单因素方差分析和*t*检验,GraphPad Prism 7对实验数据进行绘制。*P*<0.05表示差异具有统计学意义,所有实验至少重复3次。

2 结果

2.1 六味地黄汤对大鼠血糖、尿蛋白和肌酐的影响

与正常组相比,模型组的空腹血糖、尿蛋白以及肌酐水平较高,具有统计学差异(*P*<0.05);DN大鼠经过六味地黄汤干预后,空腹血糖、尿蛋白以及肌酐水平降低,且随着六味地黄汤剂量的增加,空腹血糖、尿蛋白以及肌酐水平降低越多(*P*<0.05),高剂量六味地黄汤干预效果接近厄贝沙坦干预效果,见表1。这些结果表明了六味地黄汤对于DN大鼠的保护作用。

表1 各组大鼠生化指标比较

Tab 1 Comparison of biochemical indexes of all rat groups			
组别	空腹血糖 (mmol/L)	尿蛋白 (mg/24h)	肌酐 (μmol/L)
正常组	9.32±1.51	9.44±1.11	20.41±1.18
模型组	30.32±2.01 [*]	41.41±3.32 [*]	40.05±2.78 [*]
低剂量组	26.17±1.69 [#]	37.96±1.97 [#]	38.15±1.86
中剂量组	19.06±1.14 ^{#△}	33.48±2.08 ^{#△}	34.26±2.44 ^{#△}
高剂量组	16.66±1.60 ^{#△▲}	26.74±2.15 ^{#△▲}	31.64±1.18 ^{#△▲}
厄贝沙坦组	16.02±1.67 ^{#△▲}	22.67±2.71 ^{#△▲}	31.11±2.37 ^{#△▲}
<i>F</i>	114.7	151.1	67.55
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:与正常组相比,^{*}*P*<0.05;与模型组相比,[#]*P*<0.05;与六味地黄汤低剂量组相比,[△]*P*<0.05;与六味地黄汤中剂量组相比,[▲]*P*<0.05。

2.2 六味地黄汤对大鼠肾重及肾指数的影响

相比于正常组,模型组大鼠体重显著降低(*P*<0.05),六味地黄汤治疗后,大鼠体重得到了恢复。此外,与正常组相比,模型组大鼠肾重和肾指数(肾重/体重,mg/g)显著增加(*P*<0.05);与模型组相比,六味地黄汤治疗后大鼠肾重和肾指数降低,且高剂量能显著降低肾重和肾指数(*P*<0.05)。这些研究表明,六味地黄汤能在一定程度上抑制DN大鼠肾脏肥大,见表2。

2.3 六味地黄汤对大鼠血清炎症因子的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清中IL-6和IL-1β水平显著增加(*P*<0.05);与模型组比较,六味地黄汤低、中、高剂量组大鼠IL-6和IL-1β水平显著降低(*P*<0.05);且六味地黄汤高剂量组对大鼠血清IL-6和IL-1β的抑制作用更接近厄贝沙坦,见表3。

表2 各组大鼠肾脏系数比较

Tab 2 Comparison of renal indexes of all rat groups			
组别	双肾重(g)	最终体重(g)	肾脏指数
正常组	1.46±0.09	350.17±7.21	0.42±0.08
模型组	3.37±0.16 [*]	220.83±7.12 [*]	1.52±0.09 [*]
低剂量组	2.50±0.66 [#]	232.50±7.31 [#]	1.08±0.10 [#]
中剂量组	1.99±0.08 [#]	246.33±6.14 [#]	0.81±0.07 [#]
高剂量组	1.93±0.17 ^{#△}	274.00±6.09 ^{#△▲}	0.71±0.15 ^{#△}
厄贝沙坦组	1.64±0.10 ^{#△▲}	284.00±5.33 ^{#△▲}	0.58±0.08 ^{#△▲}
<i>F</i>	34.91	50.81	95.70
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:与正常组相比,^{*}*P*<0.05;与模型组相比,[#]*P*<0.05;与六味地黄汤低剂量组相比,[△]*P*<0.05;与六味地黄汤中剂量组相比,[▲]*P*<0.05。

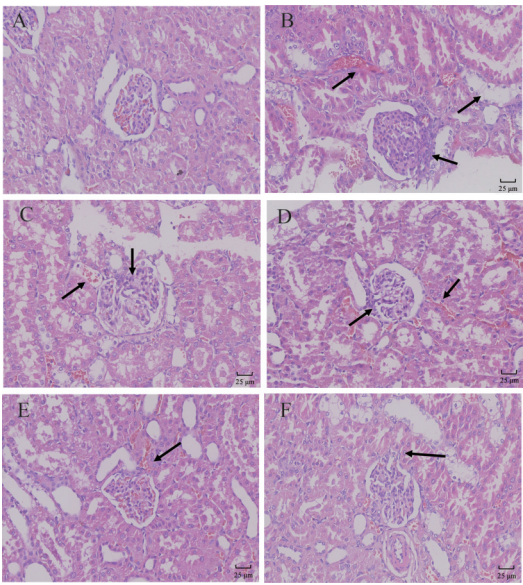
表3 各组大鼠IL-6和IL-1β比较

Tab 3 Comparison of IL-6 and IL-1β of all rat groups		
组别	IL-6(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)
正常组	22.10±2.34	47.91±4.74
模型组	77.54±2.30 [*]	217.51±6.77 [*]
低剂量组	63.64±2.90 [#]	185.16±7.90 [#]
中剂量组	56.22±5.14 [#]	164.02±7.85 [#]
高剂量组	41.36±1.98 ^{#△▲}	142.57±4.82 ^{#△▲}
厄贝沙坦组	39.16±1.93 ^{#△▲}	141.07±6.43 ^{#△▲}
<i>F</i>	77.30	43.94
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1

注:与正常组相比,^{*}*P*<0.05;与模型组相比,[#]*P*<0.05;与六味地黄汤低剂量组相比,[△]*P*<0.05;与六味地黄汤中剂量组相比,[▲]*P*<0.05。

2.4 六味地黄汤对大鼠肾脏病理的影响

由图1可以看出,正常组大鼠肾脏组织形态结构完整清晰,肾小管无萎缩,未发生明显病理变化;模型组肾小球形状不规则,出现粘连,部分肾小管

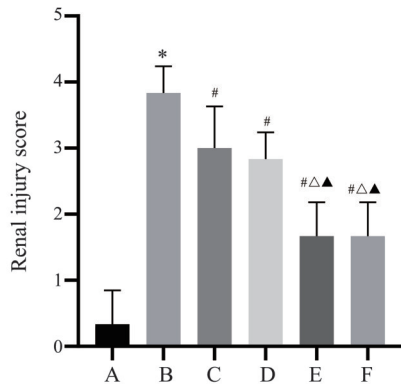


A: 正常组;B:模型组,箭头从上至下分别表示肾血管充血,肾小管扩张,肾小管上皮细胞空泡变性以及肾小球肥大,出现粘连;C:低剂量组,箭头从上至下分别表示体积增大的肾小球和异常扩张的肾小管;D:中剂量组,箭头从上至下分别表示肾小管恢复,排列紧密,肾小球体积减小;E:高剂量组,箭头表示肾小球形态较规则;F:厄贝沙坦组,箭头表示肾小球形态规则

图1 各组大鼠肾脏病理(H&E,×400)

Fig 1 The renal pathology of each group (H&E,×400)

扩张, 肾血管瘀血; 与模型组相比, 六味地黄汤处理后肾脏组织的病变程度较模型组有所好转, 肾小球, 肾血管异常变化明显改善。此外, 肾小管损伤评分显示, 六味地黄汤的干预显著抑制大鼠肾小管损伤, 且随着剂量升高, 抑制效果增强(图2)。



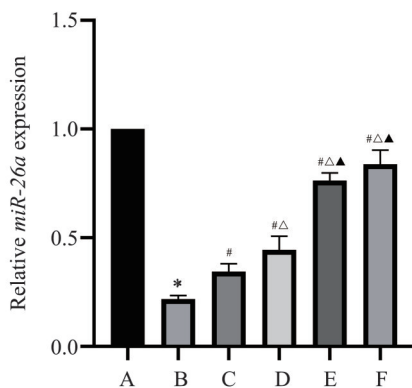
A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组; 与正常组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$; 与六味地黄汤低剂量组相比, Δ $P<0.05$; 与六味地黄汤中剂量组相比, ▲ $P<0.05$

图2 各组大鼠肾脏病理评分

Fig 2 The renal pathology score of each group

2.5 六味地黄汤对于大鼠 miR-26a 表达水平的调控

研究表明, miR-26a 在 DN 患者中异常低表达, 能够作为 DN 的一个诊断标志物, 并且影响 DN 的发生发展和治疗。为了探究六味地黄汤是否通过 miR-26a 影响 DN 进展, 使用 qPCR 检测各组大鼠肾脏组织中 miR-26a 表达水平。如图 3 所示, 相比于



A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组; 与正常组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$; 与六味地黄汤低剂量组相比, Δ $P<0.05$; 与六味地黄汤中剂量组相比, ▲ $P<0.05$

图3 各组大鼠 miR-26a 表达水平对比

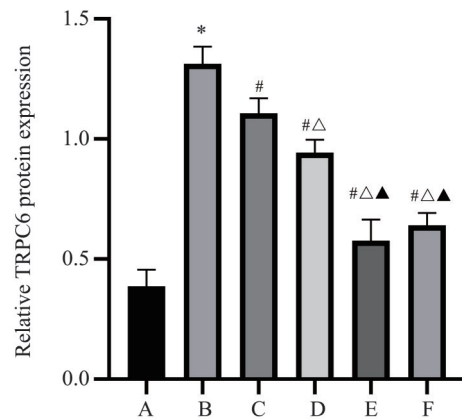
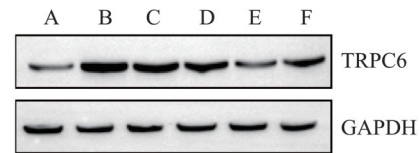
Fig 3 Comparison of the expressions of miR-26a in each group

正常对照大鼠 (1.00 ± 0.00), 模型大鼠肾脏组织中 miR-26a 表达显著降低 (0.22 ± 0.17) ($P<0.05$); 经过六味地黄汤干预后, miR-26a 表达恢复。低剂量

六味地黄汤中 miR-26a 表达水平为 (0.34 ± 0.04), 中剂量六味地黄汤中 miR-26a 表达水平为 (0.44 ± 0.06), 相比于模型组表达显著上调 ($P<0.05$)。高剂量六味地黄汤对 miR-26a 的上调作用较明显 (0.76 ± 0.04 , $P<0.05$), 其干预效果接近厄贝沙坦组 (0.84 ± 0.06)。这些数据表明六味地黄汤对 miR-26a 的调控作用。

2.6 六味地黄汤对大鼠 TRPC6 蛋白表达水平的调控

研究表明, miR-26a-TRPC6 轴与 DN 进展和治疗相关。据此, 本研究探究 TRPC6 在六味地黄汤-miR-26a 介导的 DN 调控中是否发挥作用。Western blot 结果(图4)显示, 相比于正常对照大鼠



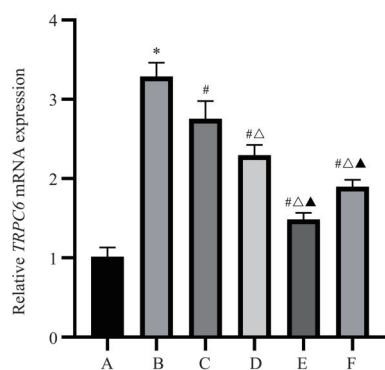
A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组; 与正常组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$; 与六味地黄汤低剂量组相比, Δ $P<0.05$; 与六味地黄汤中剂量组相比, ▲ $P<0.05$

图4 各组大鼠肾脏 TRPC6 蛋白表达水平对比

Fig 4 Comparison of the protein expressions of TRPC6 in each group

(0.39 ± 0.04), TRPC6 在模型大鼠肾脏中表达上调 (1.31 ± 0.04) ($P<0.05$); 六味地黄汤干预后, 大鼠肾脏中 TRPC6 表达被抑制。低剂量六味地黄汤中 TRPC6 表达水平为 (1.11 ± 0.04), 中剂量六味地黄汤中 TRPC6 表达水平为 (0.94 ± 0.03), 相比于模型组表达显著下调 ($P<0.05$)。在六味地黄汤高剂量组 TRPC6 抑制较明显 (0.58 ± 0.05) ($P<0.05$), 其干预效果较厄贝沙坦组好 (0.64 ± 0.03)。

进一步使用 qPCR 检测 TRPC6 表达(图5), 相比于正常对照大鼠 (1.01 ± 0.05), TRPC6 的 mRNA 水平在模型大鼠肾脏中表达上调 (3.29 ± 0.07) ($P<0.05$); 六味地黄汤干预后, 大鼠肾脏中 TRPC6 表达



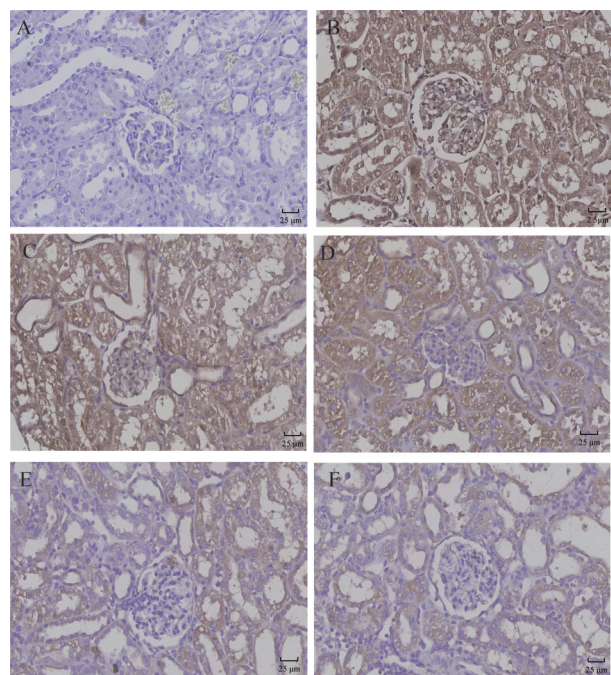
A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组; 与正常组相比, $^*P<0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P<0.05$; 与六味地黄汤低剂量组相比, $^{\Delta}P<0.05$; 与六味地黄汤中剂量组相比, $^{\blacktriangle}P<0.05$

图5 各组大鼠肾脏 TRPC6 的 mRNA 表达水平对比

Fig 5 Comparison of the mRNA expressions of TRPC6 in each group

被抑制。低剂量六味地黄汤中 TRPC6 表达水平为 (2.76 ± 0.09) , 中剂量六味地黄汤中 TRPC6 表达水平为 (2.30 ± 0.05) , 相比于模型组表达显著下调 ($P<0.05$)。在六味地黄汤高剂量组 TRPC6 抑制较明显 (1.49 ± 0.03) ($P<0.05$), 其干预效果较厄贝沙坦组好 (1.90 ± 0.03) 。

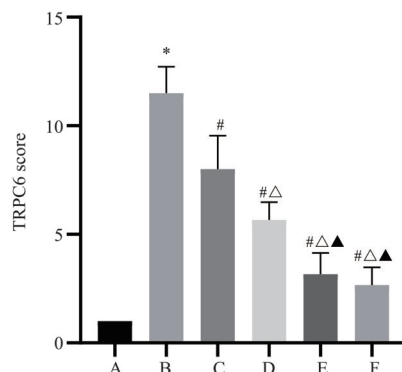
此外, 免疫组化实验结果与 Western blot 和 qPCR 结果一致, 见图 6、7。这些数据表明六味地黄汤对 TRPC6 的调控作用。



A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组

图6 各组大鼠肾脏 TRPC6 免疫组化表达水平对比 ($\times 400$)

Fig 6 Comparison of the expressions of TRPC6 in each group by immunohistochemistry ($\times 400$)



A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组; F: 厄贝沙坦组; 与正常组相比, $^*P<0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P<0.05$; 与六味地黄汤低剂量组相比, $^{\Delta}P<0.05$; 与六味地黄汤中剂量组相比, $^{\blacktriangle}P<0.05$

图7 各组大鼠肾脏表达 TRPC6 阳性程度

Fig 7 Comparison of the positive level of TRPC6 in each group

3 讨论

糖尿病是一种慢性代谢性疾病, 以高血糖为特征, 伴碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱^[12]。糖尿病肾病(DN)是糖尿病最重要的微血管并发症之一, 约 30%~40% 的糖尿病患者发展为 DN^[13]。近二十年来, 全球人口中 DN 的发病率和死亡率迅速上升^[14]。DN 的特征是细胞外基质过度沉积, 导致基底膜增厚、肾小球系膜扩张和小管间质纤维化^[15]。DN 的发病机制非常复杂, 目前尚不完全清楚, 导致治疗效果不佳。

中药因其疗效好、无毒副作用而被开发利用, 在治疗糖尿病及并发症方面历史悠久。六味地黄汤在中医中已有 900 多年的历史, 用于预防和治疗各种以肾阴虚为特征的疾病。六味地黄汤由地黄(蜀地黄)、山药(山药)、山茱萸(山茱萸)、牡丹皮(木旦皮)、泽泻(泽泻)和茯苓(茯苓)组成。尽管一些现代药理学实验已经证明六味地黄汤具有抗炎、抗氧化、抗凋亡和抗衰老的作用^[16,17], 并且已经证明六味地黄汤在 DN 中的作用, 但六味地黄汤对调控 DN 的机制尚不清楚。本研究通过使用 STZ 腹腔注射的方式构建 DN 大鼠模型, 造模成功后, 通过对比分析发现, 模型组大鼠空腹血糖、尿蛋白、肌酐和肾指数明显高于正常组, 体重有所减轻; 六味地黄汤治疗后, 空腹血糖、尿蛋白、肌酐和肾指数下降, 大鼠体重升高; 此外, 六味地黄汤处理后大鼠肾脏病理程度也减轻, 并且随着六味地黄汤剂量的升高, 抑制 DN 的效果越明显。

MicroRNAs(miRNAs)是一类短的内源性非编

码 RNA 分子,包括 19~24 个核苷酸。miRNAs 结合靶基因 mRNA 的 3' untranslated region (UTR), 引发其生物学功能,从而促进 mRNA 的降解或引起翻译抑制,最终实现基因表达调控^[18]。miRNA 的表达失调导致包括 DN 在内的多种疾病发展^[19,20]。作为一个重要的 miRNA, miR-26a 在抗炎^[21]、抗氧化^[22]以及抗纤维化^[23]等过程中发挥作用。这些生物过程被认为是 DN 发展的重要机制^[24]。研究发现,在 DN 患者中, miR-26a 表达下调,且 miR-26a 参与 DN 进展和治疗的调控。这些研究表明, miR-26a 能够作为 DN 诊断和预后的生物标志物。基于六味地黄汤能够通过影响相关分子表达水平进而影响糖尿病等疾病发生的研究^[25],本研究推测六味地黄汤可以通过调控 miR-26a 表达影响 DN 进展。结果显示,相比于正常对照大鼠, miR-26a 在模型大鼠肾脏中表达下调;而六味地黄汤的处理能够上调 miR-26a 表达,且呈现一定的剂量依赖性升高。证明六味地黄汤可能通过 miR-26a 发挥作用。

TRPC6 是一种 Ca^{2+} 可渗透的非选择性阳离子通道,在脑、含平滑肌组织和肾脏以及免疫细胞和血细胞中表达。在 TRPC6 敲除的大鼠和小鼠中,肾病综合征、DN、自身免疫性肾小球肾炎和肾缺血和尿路梗阻引起的急性肾损伤得到了一定程度的改善^[26]。TRPC6 的表达与 DN 进展呈正相关,并且能够作为预防 DN 的靶点^[27]。通过文献检索,发现 TRPC6 是 miR-26a 的下游靶蛋白,受到 miR-26a 的调控,且 miR-26a/TRPC6 轴已被报道参与 DN 的进展^[9]。本研究结果显示, DN 大鼠中 TRPC6 高表达;六味地黄汤干预抑制 TRPC6 表达水平,高剂量的六味地黄汤处理后 TRPC6 表达下调对比低剂量和中剂量更明显。证明六味地黄汤可能通过 TRPC6 发挥调控作用。

综上所述,六味地黄汤对 DN 大鼠的肾脏具有保护作用,可能通过上调 miR-26a,抑制 TRPC6 表达实现。本研究可为 DN 的临床预防提供新的思路,也可为六味地黄汤的肾脏保护机制研究提供参考。

作者贡献度说明:

李杨:设计文章研究思路、实验进行和数据分析、论文的起草;温伟波:提供研究思路、论文最终版本的修订。

本研究不存在研究者、伦理委员会成员、受试者监护人以及与公开研究成果有关的利益冲突。

参考文献

- 1 Elendu C, John Okah M, Fiemotongha KD, et al. Comprehensive advancements in the prevention and treatment of diabetic nephropathy: A narrative review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(40): e35397.
- 2 Talukdar A, Basumatary M. Rodent models to study type 1 and type 2 diabetes induced human diabetic nephropathy [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(9): 7759-7782.
- 3 姜金玲. 六味地黄汤对糖尿病肾病患者的治疗效果 [J]. *中国城乡企业卫生*, 2021, 36(10): 147-148.
Jiang J. The therapeutic effect of Liuwei Dihuang Decoction on diabetic nephropathy patients [J]. *Chin J Urban Rural Ind Hyg*, 2021, 36(10): 147-148.
- 4 谢龙. 观察六味地黄汤加味治疗糖尿病肾病的临床疗效 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(5): 173-174.
Xie L. The clinical efficacy of Liuwei Dihuang Decoction in the treatment of diabetic nephropathy [J]. *World Latest Med Inf Dig*, 2019, 19(5): 173-174.
- 5 Kaur P, Kotru S, Singh S, et al. miRNA signatures in diabetic retinopathy and nephropathy: Delineating underlying mechanisms [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(1): 19-37.
- 6 Ji J, Shi H, Li Z, et al. Satellite cell-derived exosome-mediated delivery of microRNA-23a/27a/26a cluster ameliorates the renal tubulointerstitial fibrosis in mouse diabetic nephropathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2455-2468.
- 7 Fu Y, Wang C, Zhang D, et al. Increased TRPC6 expression is associated with tubular epithelial cell proliferation and inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Mol Immunol*, 2018, 94: 75-81.
- 8 Zhang S, Wang H, Liu Y, et al. Tacrolimus ameliorates tubulointerstitial inflammation in diabetic nephropathy *via* inhibiting the NFATc1/TRPC6 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9810-9824.
- 9 Zhou Y, Li Z, 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.
- 10 冷昌龙, 皮明山, 龚晓康. 单次大剂量对比多次小剂量 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(9): 6.
Leng C, Pi M, Gong X. Single high-dose versus multiple low-dose streptozotocin for inducing diabetic nephropathy in C57BL/6J mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(9): 6.
- 11 Creyten D. NKX2.2 immunohistochemistry in the dis-

- inction of Ewing sarcoma from cytomorphologic mimics: Diagnostic utility and pitfalls-Comment on Russell-Goldman *et al* [J]. *Cancer Cytopathol*, 2019, 127(3): 202.
- 12 American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*, 2018, 41(Suppl 1): S13-S27.
- 13 Umanath K, Lewis JB. Update on diabetic nephropathy: Core curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 884-895.
- 14 Heerspink HJ, Parving HH, Andress DL, et al. Atrasentan and renal events in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease (SONAR): A double-blind, randomised, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10184): 1937-1947.
- 15 Barrera-Chimal J, Jaisser F. Pathophysiologic mechanisms in diabetic kidney disease: A focus on current and future therapeutic targets [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(Suppl 1): 16-31.
- 16 Zeng J, Zhang X, Wang J, et al. Comparison of donepezil, memantine, melatonin, and Liuwei Dihuang Decoction on behavioral and immune endocrine responses of aged senescence-accelerated mouse resistant 1 mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 350.
- 17 He D, Huang J, Zhang Z, et al. A network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Liuwei Dihuang Pill in treating type 2 diabetes mellitus [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 949.
- 18 Xi E, Bai J, Zhang K, et al. Genomic variants disrupt miRNA-mRNA regulation[J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19(10): e202200623.
- 19 He X, Kuang G, Wu Y, et al. Emerging roles of exosomal miRNAs in diabetes mellitus [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(6): e468.
- 20 Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- 21 Yu T, Wang P, Wu Y, et al. miR-26a reduces inflammatory responses *via* inhibition of PGE2 production by targeting COX-2[J]. *Inflammation*, 2022, 45(4): 1484-1495.
- 22 Wen X, Yin Y, Li X, et al. Effect of miR-26a-5p targeting *ADAM17* gene on apoptosis, inflammatory factors and oxidative stress response of myocardial cells in hypoxic model [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52: 83-92.
- 23 Wang B, Zhang A, Wang H, et al. miR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1864-1877.
- 24 裴文丽, 史晓伟, 连琄, 等. 中医药防治糖尿病肾病的作用机制[J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37(12): 16-19.
- Pei W, Shi X, Lian G, et al. Mechanism of Chinese medicine in prevention and treatment of diabetic nephropathy[J]. *J PracTradit Chin Intern Med*, 2023, 37(12): 16-19.
- 25 Yuan M, He Q, Long Z, et al. Exploring the pharmacological mechanism of Liuwei Dihuang Decoction for diabetic retinopathy: A systematic biological strategy-based research [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5544518.
- 26 Dryer S, Kim EY. The effects of TRPC6 knockout in animal models of kidney disease [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1710.
- 27 Yao X, Guo H, Sun M, et al. Klotho ameliorates podocyte injury through targeting TRPC6 channel in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2022, 2022: 1329380.

[本文编辑] 雷 燕 宋睿璞 陈思润