

雌马酚通过 *CCDC92* 调控 AMPK/mTOR 通路 对糖尿病肾病足细胞损伤的作用及机制研究

Research on the effects and mechanism of equol regulating AMPK/mTOR pathway by *CCDC92* in podocyte injury of diabetic nephropathy

李霜青, 刘 艳, 周韩菁

(浙江省金华市中心医院 肾内科, 浙江 金华
321000)

LI Shuang-qing, LIU Yan,
ZHOU Han-jing

(Department of Nephrology, Jinhua
Municipal Central Hospital, Jinhua
321000, Zhejiang Province, China)

摘要:目的 研究雌马酚(equol)通过含卷曲螺旋结构域 92(*CCDC92*)调控腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路对糖尿病肾病(DN)足细胞损伤的作用及其机制。方法 将小鼠 MPC5 细胞分为对照组(不做任何处理),模型组($30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 48 h),实验组(在模型组基础上, $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Equol 处理 24 h),AAV-NC 组(在实验组基础上,转染 AAV-NC)和 AAV-*CCDC92* 组(在实验组基础上,转染 AAV-*CCDC92*)。用噻唑蓝实验法检测细胞存活率,用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 *CCDC92* mRNA 水平,用 Transwell 实验法检测细胞侵袭能力,用免疫荧光实验法检测足细胞分化因子(Podocin)和肾病蛋白(Nephrin)的蛋白表达水平,用蛋白免疫印迹法检测微管相关蛋白 1 轻链 3II型/I型(LC3II/I)、Beclin 1(Beclin-1)、AMPK 和 mTOR 相关蛋白表达。结果 对照组、模型组和实验组的细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 2.84)\%$ 、 $(64.91 \pm 9.57)\%$ 和 $(81.36 \pm 13.19)\%$ 。对照组、模型组、实验组、AAV-NC 组和 AAV-*CCDC92* 组的 *CCDC92* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 2.26 ± 0.35 、 1.42 ± 0.19 、 1.48 ± 0.22 和 2.05 ± 0.34 ,细胞侵袭个数分别为 (79.35 ± 11.62) 、 (25.81 ± 4.06) 、 (53.69 ± 7.95) 、 (60.46 ± 10.58) 和 (41.13 ± 7.27) 个, Nephrin 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.31 ± 0.05 、 0.65 ± 0.09 、 0.58 ± 0.08 和 0.39 ± 0.06 , Podocin 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 0.28 ± 0.04 、 0.61 ± 0.11 、 0.56 ± 0.09 和 0.32 ± 0.06 , LC3II/I 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 0.26 ± 0.04 、 0.74 ± 0.12 、 0.69 ± 0.11 和 0.41 ± 0.08 , Beclin1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.32 ± 0.06 、 0.68 ± 0.10 、 0.75 ± 0.12 和 0.46 ± 0.07 , 磷酸化(p)-AMPK/AMP 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 0.23 ± 0.04 、 0.86 ± 0.17 、 0.89 ± 0.16 和 0.38 ± 0.07 , p-mTOR/mTOR 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 3.16 ± 0.53 、 1.72 ± 0.31 、 1.65 ± 0.29 和 2.91 ± 0.52 。模型组的上述指标与对照组相比,实验组与模型组相比,AAV-*CCDC92* 组与 AAV-NC 组相比,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 雌马酚可以通过 *CCDC92* 减轻 DN 足细胞损伤,该作用可能与调控 AMPK/mTOR 通路,提高自噬水平有关。

关键词:雌马酚;糖尿病肾病;含卷曲螺旋结构域 92;足细胞损伤;自噬

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.008

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2026)01-0047-06

基金项目:金华市科技计划基金资助项目
(2024-3-064)

作者简介:李霜青(1976-),女,副主任医师,
主要从事糖尿病肾病方面的工作和
研究

通信作者:李霜青

MP:13735761966

E-mail:13735761966@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of equol on podocyte injury in diabetic nephropathy (DN) by regulating the AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway by coiled-coil domain containing 92 (*CCDC92*).

Methods Mouse MPC5 cells were divided into five groups: the control

group (without any treatment), the model group (treated with $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose for 48 h), the experimental group (treated with $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ equol for 24 h on the basis of the model group), the AAV-NC group (transfected with AAV-NC on the basis of the experimental group) and the AAV-CCDC92 group (transfected with AAV-CCDC92 on the basis of the experimental group). Cell viability was detected by the methyl thiazolyl tetrazolium assay. The mRNA level of *CCDC92* was determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Cell invasive ability was assessed by the transwell assay. The protein relative expression levels of Podocin and Nephlin were detected by immunofluorescence assay. The protein relative expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I (LC3 II/I), Beclin-1, AMPK and mTOR related proteins were measured by Western blot. **Results** The cell viability rates of the control group, model group and experimental group were $(100.00 \pm 2.84)\%$, $(64.91 \pm 9.57)\%$ and $(81.36 \pm 13.19)\%$, respectively; the relative expression levels of *CCDC92* mRNA in the control group, model group, experimental group, AAV-NC group and AAV-CCDC92 group were 1.00 ± 0.12 , 2.26 ± 0.35 , 1.42 ± 0.19 , 1.48 ± 0.22 and 2.05 ± 0.34 , respectively; the number of invasive cells were (79.35 ± 11.62) , (25.81 ± 4.06) , (53.69 ± 7.95) , (60.46 ± 10.58) and (41.13 ± 7.27) cells, respectively; the relative expression levels of Nephlin protein were 1.00 ± 0.14 , 0.31 ± 0.05 , 0.65 ± 0.09 , 0.58 ± 0.08 and 0.39 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of Podocin protein were 1.00 ± 0.17 , 0.28 ± 0.04 , 0.61 ± 0.11 , 0.56 ± 0.09 and 0.32 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of LC3 II/I protein were 1.00 ± 0.17 , 0.26 ± 0.04 , 0.74 ± 0.12 , 0.69 ± 0.11 and 0.41 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of Beclin1 protein were 1.00 ± 0.15 , 0.32 ± 0.06 , 0.68 ± 0.10 , 0.75 ± 0.12 and 0.46 ± 0.07 , respectively; the relative expression levels of phosphorylated (p)-AMPK/AMPK protein were 1.00 ± 0.19 , 0.23 ± 0.04 , 0.86 ± 0.17 , 0.89 ± 0.16 and 0.38 ± 0.07 , respectively; the relative expression levels of p-mTOR/mTOR protein were 1.00 ± 0.16 , 3.16 ± 0.53 , 1.72 ± 0.31 , 1.65 ± 0.29 and 2.91 ± 0.52 , respectively. There were statistically significant differences in the above indicators between the model group and the control group, between the experimental group and the model group and between the AAV-CCDC92 group and the AAV-NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Equol can alleviate podocyte injury in DN through *CCDC92*, and the effects may be related to regulating the AMPK/mTOR pathway and improving autophagy level.

Key words: equol; diabetic nephropathy; coiled-coil domain containing 92; podocyte injury; autophagy

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者病程中常见的累及微血管的并发症,全球约30%的糖尿病患者会进展为DN^[1]。现代医学尚无针对DN的特效治疗药物,治疗仍仅限于通过降糖、降压和抗蛋白尿作用延缓肾损害,但药物控制会产生胃肠道药物不良反应等^[2]。故寻找有效防治DN的干预策略及探索其机制具有重要意义。足细胞作为维持肾小球滤过屏障完整性的终末分化细胞可以阻止蛋白质渗出,其损伤与白蛋白尿产生和肾功能恶化密切相关^[3]。有研究发现,含卷曲螺旋结构域92(coiled-coil domain containing 92, *CCDC92*)基因的特定遗传变异与脂质代谢、2型糖尿病相关,其可以通过抑制胆固醇外流导致脂质积累,从而促进足细胞损伤,表明靶向*CCDC92*可能是缓解足细胞损伤的新方向^[4]。雌马酚(equol)属于大豆异黄酮的代谢产物,在最近的研究中被发现可以通过调控脂质代谢、线粒体自噬紊乱、抗氧化应激等途径对糖尿病、肥胖等疾病的防治发挥积极

作用^[5-6]。本研究旨在探讨雌马酚通过调控*CCDC92*对DN足细胞损伤的干预效应及可能的机制。

材料与方法

1 材料

细胞 小鼠肾小球足细胞MPC5,购自宁波明舟生物科技有限公司。

药物与试剂 雌马酚,规格:每瓶1 mg,纯度: $\geq 99\%$,货号:45405-1MG,批号:BCCD5240,美国Merck公司生产;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒,上海碧云天生物公司生产;CCDC92、螯合体1(sequestosome 1, p62)、苋氯素1(Beclin1)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、肾病蛋白(Nephlin)抗体,均由武汉三鹰生物技术有限公司生产;磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)、

磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK)、微管相关蛋白1轻链3 I型/II型(microtubule-associated protein 1 light chain 3 I/II, LC3 I/II)抗体,均由艾比玛特医药科技(上海)有限公司生产;足细胞分化因子(Podocin)抗体,德国 Merck KGaA 公司生产; α -微管蛋白(α -Tubulin)及二抗,均由英国Abcam公司生产。

仪器 ChemiDoc MP 化学发光凝胶成像系统,美国Bio Rad 公司产品;CFX384 实时荧光定量 PCR 仪,美国伯乐公司产品;DM3000 生物显微镜、DM2500 荧光显微镜,均为德国徕卡公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养、分组与处理方法^[7]

MPC5 细胞置于含 $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ γ 干扰素和 10% 胎牛血清的杜氏改良 Eagle 培养液中,于 33°C 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞密度达 60% 时,更换为不含 γ 干扰素的培养液,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,细胞密度达到 80% 左右时进行传代培养。将处于对数生长期的 MPC5 细胞分为对照组(MPC5 细胞正常培养不做任何处理),模型组($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 MPC5 细胞 48 h),实验组(在模型组基础上, $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌马酚处理 MPC5 细胞 24 h), AAV-NC 组(在实验组基础上,将 AAV-NC 转染至 MPC5 细胞)和 AAV-CCDC92 组(在实验组基础上,将 AAV-CCDC92 转染至 MPC5 细胞)。后续实验操作中,MTT 实验设置 5 个复孔,实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和 Transwell 实验均设置 3 个复孔。

2.2 MTT 实验法检测 MPC5 细胞增殖^[8]

取对数生长期待检测的 MPC5 细胞,以每毫升 2×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱继续培养,细胞融合后更换无血清培养基继续培养 8 h,细胞分组后加入相应培养基培养 48 h,每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$,培养 4 h,弃上清,每孔加入二甲亚砜 $150 \text{ } \mu\text{L}$ 混匀,待紫色结晶全部溶解,用酶标仪测定各孔在 570 nm 的光密度值,计算细胞存活率。

2.3 qRT-PCR 法检测 MPC5 细胞中 CCDC92 mRNA 的水平

按照“2.1”分组制取细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录后进行扩增,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,检测 CCDC92 mRNA 相对表达水平,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行定量分析。引物由杭州有康生物科技有限公司设计合成,序列如下,CCDC92 上游引

物:5'-TGAGCTGACACTCAAAAGTTTCG-3',下游引物:5'-CTCTCTCTCACGGACTGTGTT-3'; β -actin 上游引物:5'-CTCACCATGGATGATGATATCGC-3',下游引物:5'-AGGAATCCTTCTGACCCATGC-3'。

2.4 Transwell 实验法检测 MPC5 细胞的侵袭能力^[8]

取对数生长期 MPC5 细胞,用无血清培养基将细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个,于 24 孔 Transwell 小室上室中加入细胞悬液 $200 \text{ } \mu\text{L}$,下室加入完全培养基 $600 \text{ } \mu\text{L}$,按照分组培养后取出小室,用磷酸盐缓冲液漂洗,用 0.1% 结晶紫染色,用棉签擦去上室未迁移细胞,随机选取 5 个视野,用显微镜观察计数。

2.5 免疫荧光实验法检测 MPC5 细胞中足细胞损伤标志物 Nephlin 和 Podocin 蛋白的表达水平

4% 多聚甲醛固定各组干预后的 MPC5 细胞 10 min,柠檬酸盐缓冲液加热修复抗原(用微波修复法,加热至 $95 \sim 100^\circ\text{C}$,保持该温度放入玻片 10 min),3% 牛血清白蛋白封闭 30 min,滴加一抗 Nephlin 稀释液(1:100)于 4°C 冰箱过夜,洗涤后,与 Alexa Fluor[®] 488 偶联山羊抗兔二抗(1:1 000)孵育 1 h。对 Podocin(1:100)重复此步骤,室温下与 Alexa Fluor[®] 647 偶联山羊抗小鼠二抗(1:1 000)孵育后,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核,用抗荧光衰减封片剂封片,用荧光显微镜观察。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)检测 MPC5 细胞中 CCDC92、LC3、p62、Beclin1 和 AMPK/mTOR 通路相关蛋白的相对表达水平

提取各组细胞蛋白,测蛋白浓度,凝胶电泳转膜后,5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,一抗 CCDC92(1:600)、LC3 I/II(1:1 000)、p62(1:3 000)、Beclin1(1:1 000)、AMPK(1:5 000)、p-AMPK(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、 α -Tubulin(1:1 000)在 4°C 下孵育过夜,用辣根过氧化物酶标记二抗(1:1 000)孵育后电化学发光显色,用 Image J 软件定量蛋白表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,2 组间比较用 LSD 检验。

结 果

1 equol 对 MPC5 细胞增殖的影响

对照组细胞正常培养不做任何处理,模型组细胞

使用 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 48 h, 实验组细胞基于模型组, 用 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ equol 处理 24 h。用 MTT 实验法检测各组 MPC5 细胞的存活率, 结果显示, 对照组、模型组和实验组的细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 2.84)\%$ 、 $(64.91 \pm 9.57)\%$ 和 $(81.36 \pm 13.19)\%$ 。模型组与对照组相比, 实验组与模型组相比, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

2 equol 对 MPC5 细胞中 CCDC92 表达水平的影响

模型组与对照组相比, 实验组与模型组相比, AAV - CCDC92 组与 AAV - NC 组相比, CCDC92 mRNA 和蛋白相对表达水平比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); AAV - NC 组与实验组相比, 在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

3 equol 介导 CCDC92 对 MPC5 细胞侵袭的影响

对照组、模型组、实验组、AAV - NC 组和 AAV - CCDC92 组的细胞侵袭个数分别为 (79.35 ± 11.62) 、 (25.81 ± 4.06) 、 (53.69 ± 7.95) 、 (60.46 ± 10.58) 和 (41.13 ± 7.27) 个, 模型组与对照组相比, 实验组与模型组相比, AAV - CCDC92 组与 AAV - NC 组相比, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); AAV - NC 组与实验组相比, 在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 equol 介导 CCDC92 对 MPC5 细胞自噬的影响

与对照组相比, 模型组 MPC5 细胞中 LC3 II / I 和

Beclin1 蛋白相对表达水平均显著降低, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平显著升高, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 MPC5 细胞中 LC3 II / I 和 Beclin1 蛋白相对表达水平均升高, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平降低, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与实验组相比, AAV - NC 组 MPC5 细胞中 LC3 II / I、p62 和 Beclin1 蛋白相对表达水平比较在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 AAV - NC 组相比, AAV - CCDC92 组 MPC5 细胞中 LC3 II / I 和 Beclin1 蛋白相对表达水平均降低, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平升高, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 2 和图 1。

表 2 各组 MPC5 细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、整合体 1 (p62) 和 苊氯素 1 (Beclin1) 蛋白相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of protein relative expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), sequestosome 1 (p62) and Beclin1 in MPC5 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LC3 II / I	p62	Beclin1
Control	8	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.15
Model	8	0.26 ± 0.04 ***	2.64 ± 0.45 ***	0.32 ± 0.06 ***
Experimental	8	0.74 ± 0.12 △△△	1.39 ± 0.22 △△△	0.68 ± 0.10 △△△
AAV - NC	8	0.69 ± 0.11	1.31 ± 0.23	0.75 ± 0.12
AAV - CCDC92	8	0.41 ± 0.08 ▲▲▲	2.28 ± 0.36 ▲▲▲	0.46 ± 0.07 ▲▲▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with the AAV - NC group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

表 1 各组 MPC5 细胞中卷曲螺旋结构域 92 (CCDC92) mRNA 和蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of coiled-coil domain containing 92 (CCDC92) mRNA and protein levels in MPC5 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CCDC92 mRNA	CCDC92 protein
Control	8	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.15
Model	8	2.26 ± 0.35 ***	2.81 ± 0.49 ***
Experimental	8	1.42 ± 0.19 △△△	1.59 ± 0.26 △△△
AAV - NC	8	1.48 ± 0.22	1.67 ± 0.28
AAV - CCDC92	8	2.05 ± 0.34 ▲▲	2.53 ± 0.41 ▲▲▲

Control group: Without any treatment; Model group: Treated with $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose for 48 h; Experimental group: Treated with $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ equol for 24 h on the basis of the model group; AAV - NC group: Transfected with AAV - NC on the basis of the experimental group; AAV - CCDC92 group: Transfected with AAV - CCDC92 on the basis of the experimental group; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with the AAV - NC group, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.001$.

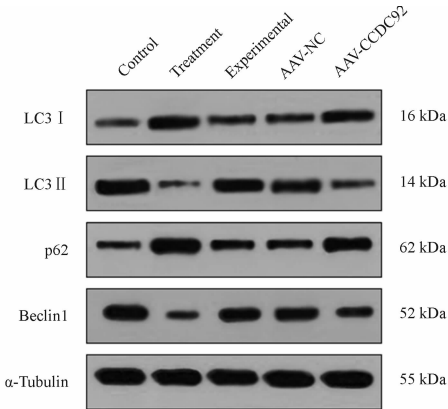


图 1 蛋白质印迹法检测各组 MPC5 细胞中 LC3、p62 和 Beclin1 蛋白相对表达水平

Figure 1 Detection of the relative expression levels of LC3, p62 and Beclin1 proteins in MPC5 cells of each group by Western blot assay

5 equol 介导 CCDC92 对 MPC5 细胞损伤的影响

模型组与对照组相比,实验组与模型组相比, AAV - CCDC92 组与 AAV - NC 组相比, Neph rin 和 Podocin 蛋白相对表达水平在统计学上差异均有统计 学意义(均 $P < 0.001$); AAV - NC 组与实验组相比, 在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见表 3。

6 equol 介导 CCDC92 对 MPC5 细胞中 AMPK/ mTOR 通路的影响

模型组与对照相比,实验组与模型组相比, AAV - CCDC92组与 AAV - NC 组相比, p - AMPK/ AMPK 和 p - mTOR/mTOR 相对表达水平在统计学上 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$); AAV - NC 组与 实验组相比,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 4 和图 2。

表 3 各组 MPC5 细胞中肾病蛋白和足细胞分化因子蛋白水 平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of Neph rin and Podocin protein relative expression levels in MPC5 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Neph rin	Podocin
Control	8	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.17
Model	8	0.31 ± 0.05 ***	0.28 ± 0.04 ***
Experimental	8	0.65 ± 0.09 △△△	0.61 ± 0.11 △△△
AAV - NC	8	0.58 ± 0.08	0.56 ± 0.09
AAV - CCDC92	8	0.39 ± 0.06 ▲▲▲	0.32 ± 0.06 ▲▲▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with AAV - NC group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

表 4 各组 MPC5 细胞中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳 动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路相关蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of AMP - activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway - related protein relative expression levels in MPC5 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p - AMPK/AMPK	p - mTOR/mTOR
Control	8	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.16
Model	8	0.23 ± 0.04 ***	3.16 ± 0.53 ***
Experimental	8	0.86 ± 0.17 △△△	1.72 ± 0.31 △△△
AAV - NC	8	0.89 ± 0.16	1.65 ± 0.29
AAV - CCDC92	8	0.38 ± 0.07 ▲▲▲	2.91 ± 0.52 ▲▲▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with treatment group, △△△ $P < 0.001$; Compared with AAV - NC group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

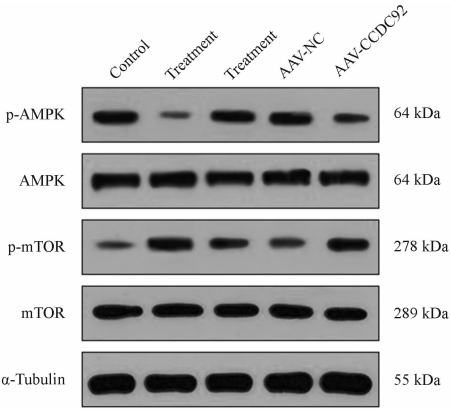


图 2 蛋白质印迹法检测各组 MPC5 细胞中 AMPK/mTOR 通 路相关蛋白相对表达水平

Figure 2 Western blot assay to detect the relative expression levels of AMPK/mTOR pathway - related proteins in MPC5 cells of each group

讨 论

DN 发病机制复杂,其病程涉及脂代谢紊乱、血流 动力学、炎症、氧化应激、自噬、免疫功能异常等过程, 而足细胞损伤不仅是 DN 的重要病理特征之一,同时 也是导致肾小球硬化、肾功能衰竭、蛋白尿的主要 原因^[9-10]。肾脂肪蓄积是“脂质肾毒性学说”的重要 内容,过量脂质在足细胞中累积引起的细胞功能障碍 是 DN 进展的关键环节之一^[11]。有文献报道,肝脂质 生成增多可能与雌激素水平不足相关, equol 具有替 代合成雌激素特性和抗氧化特性,补充 equol 能够明 显改善人肝癌细胞脂肪变性^[12]。另有研究指出, equol 对糖尿病肾病的肾功能具有改善作用,且可以 通过干预 MPC5 细胞表皮生长因子受体通路激活,抑 制细胞凋亡,这些发现为其治疗 DN 足细胞损伤提供 了新视角^[7, 13]。本研究证实了 equol 对高糖诱导足 细胞存活率的提升作用,提示其在肾足细胞损伤的预防 和辅助治疗中存有一定的应用价值,但具体的分子机 制尚不清楚。

CCDC92 基因变异与胰岛素抵抗的外周脂肪量密 切相关^[14]。ZUO 等^[15]在临床和动物的研究中发现, 其表达水平在糖尿病肾病患者的足细胞中上调,且与 患者肾小球脂质积累呈正相关;而沉默 CCDC92 基因 可以改善 DN 小鼠中的足细胞脂毒性,过表达 CCDC92 则会增加 DN 小鼠肾小球中的白蛋白尿以及 脂质积累,提示 CCDC92 可能成为 DN 足细胞损伤的 潜在靶标。本研究同样观察到, CCDC92 基因在高糖 诱导的 MPC5 细胞中高表达。此外,本研究还发现,

模型组细胞侵袭能力和自噬能力减弱,LC3 II/I、Beclin1蛋白表达水平均降低,p62蛋白表达水平升高,而 equol 干预可以通过下调 *CCDC92* 表达,纠正细胞的侵袭和自噬能力,促进足细胞受损成分的清除与修复。这与于生财等^[16]在 L6 大鼠成肌细胞的研究中发现, equol 干预后可以通过增强细胞自噬,降低 p62 蛋白表达水平和 LC3 - I/LC3 - II 比值来改善棕榈酸诱导的 L6 细胞萎缩的结果一致。Nephrin、Podocin 是足细胞裂孔隔膜上的重要结构蛋白,其在高糖状态下表达不足提示足细胞损伤^[17]。在本研究中, equol 干预可以通过 *CCDC92* 提高这 2 种足细胞结构蛋白表达,减轻高糖对足细胞的损伤,韩佳瑞等^[18]研究显示,芪黄固肾通络方提高 Nephrin、Podocin 表达,维持足细胞正常结构和功能,减轻足细胞损伤,与本研究结果相似。这表明, equol 对足细胞的保护作用机制之一,可能是通过增强足细胞的自噬能力实现的。

自噬是维持细胞内稳态的关键途径, AMPK/mTOR 是介导自噬的经典信号通路, AMPK 不仅能够调节基本的细胞生理过程,还可以通过磷酸化 mTOR 的亚基,抑制其活性来诱导自噬,已有多项研究表明,中医药可以通过调节该通路靶向自噬,防治糖尿病肾病^[19-20]。本研究发现, equol 能够通过 *CCDC92* 活化 AMPK/mTOR 通路,可见 p - AMPK/AMPK 表达上调, p - mTOR/mTOR 表达下调,同前述自噬能力增强的趋势一致。王楠等^[21]报道显示,当归芍药散调控自噬相关蛋白表达,激活 AMPK/mTOR 通路,保护糖尿病相关足细胞损伤,与本研究结果吻合。

本研究提示: equol 可以通过 *CCDC92* 减轻 DN 足细胞损伤,该作用可能与调控 AMPK/mTOR 通路,提高自噬水平有关。

参考文献:

- [1] WANG N, ZHANG C. Recent advances in the management of diabetic kidney disease: Slowing progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6):3086.
- [2] 蒋丹容,康晓平,林冬梅,等. 灵芝多糖肽对糖尿病肾病小鼠肾脏抗氧化应激及免疫炎症的作用及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(1):39—45.
- [3] 郭克磊,李颖利,宣晨光,等. 益气养阴化浊通络方通过调控 *miR - 21a - 5p/FoxO1/PINK1* 介导的线粒体自噬减轻糖尿病肾病小鼠的足细胞损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(1):27—34.
- [4] ZUO F W, LIU Z Y, WANG M W, *et al.* Ccdc92 promotes podocyte injury by regulating pa28alpha/abca1/cholesterol efflux axis in type

- 2 diabetic mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(5):1019—1031.
- [5] 张贵明,倪向敏,崔涵强,等. 雌马酚对肥胖模型大鼠脂代谢的影响[J]. *营养学报*, 2023, 45(3):287—293.
- [6] 李正宙,倪向敏,白倩,等. 雌马酚对高糖高脂诱导的成骨细胞线粒体损伤的保护作用[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(11):1152—1160.
- [7] 杜学识,倪向敏,梁馨予,等. 雌马酚对 DN 的保护作用及潜在靶点[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62(8):49—58.
- [8] 戚婷,孙维言,唐小铁. 桔梗皂苷 D 对高糖诱导小鼠足细胞损伤及抗氧化酶 2/核因子 κ B 通路影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2023, 31(11):838—844.
- [9] 王茂泓,郑航,李雪,等. 基于 PERK - eIF2 α - ATF4 - CHOP 通路探讨中医药干预糖尿病肾病的作用机制[J]. *科学技术与工程*, 2025, 25(8):3079—3088.
- [10] 白俊嫒,戴恩来,蒲晓薇,等. 淫羊藿苷联合地塞米松对阿霉素诱导足细胞损伤的保护作用[J]. *世界中医药*, 2025, 20(9):1506—1512, 1519.
- [11] 陈智鸿,王林,黄津华. 高脂饮食诱导下小鼠肾脏组织蛋白质组学研究[J]. *浙江医学*, 2023, 45(24):2600—2604, 2691—2692.
- [12] 张贵明,倪向敏,崔涵强,等. 雌马酚干预改善油酸钠诱导的 HepG2 细胞脂肪变性[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(3):202—208.
- [13] 李硕,倪向敏,徐喆,等. 雌马酚对 2 型糖尿病大鼠的肾脏保护作用[J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(10):1009—1017.
- [14] REN L, DU W, SONG D, *et al.* Genetic ablation of diabetes - associated gene *CCDC92* reduces obesity and insulin resistance in mice[J]. *iScience*, 2023, 26(1):105769.
- [15] ZUO F, WANG Y, XU X, *et al.* *CCDC92* deficiency ameliorates podocyte lipotoxicity in diabetic kidney disease[J/OL]. *Metabolism*, 2024, 150:155724. 2023 - 11 - 11 [2025 - 08 - 14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37952690/>.
- [16] 于生财,倪向敏,卢亨,等. 雌马酚通过调控自噬干预棕榈酸诱导的 L6 细胞肌管萎缩[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(15):1604—1611.
- [17] 杨绍玮,邓德强. 雪莲益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用机制[J]. *世界中医药*, 2025, 20(11):1882—1888.
- [18] 韩佳瑞,王学艺,朱清,等. 芪黄固肾通络方调控脂代谢和自噬保护足细胞治疗糖尿病肾病[J]. *世界中医药*, 2025, 20(11):1862—1873.
- [19] 杨世睿,周婷婷,马超超,等. 中医药干预 mTOR 通路靶向自噬防治糖尿病肾病的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(11):1675—1678.
- [20] 闫萌萌,徐林丽,刘岩岩,等. 苦杏仁苷对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞损伤的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(7):1019—1023.
- [21] 王楠,张紫薇,周静,等. 当归补血汤通过 AMPK/mTOR 通路改善人肾足细胞自噬的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(4):15—21.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2025 - 09 - 22)