



# 英克司兰通过转录生长因子 $\beta$ 通路对2型糖尿病小鼠模型肾组织保护作用及机制研究\*

李泓倩<sup>1</sup>, 陈波<sup>2</sup>, 向馨<sup>3</sup>, 戚凌<sup>1</sup>, 张冬梅<sup>1</sup>, 唐雨涵<sup>1</sup>, 张丽玲<sup>1</sup>,  
欧三桃<sup>1</sup>, 薛玲<sup>4</sup>, 吴蔚桦<sup>1</sup> $\Delta$

1. 西南医科大学附属医院 肾内科/四川省肾脏病临床研究中心/四川省代谢性疾病重点实验室(泸州 646000);

2. 西南医科大学基础医学院 解剖学教研室(泸州 646000); 3. 西南医科大学(泸州 646000);

4. 西南医科大学附属医院 泌尿外科/四川省肾脏病临床研究中心(泸州 646000)

**【摘要】目的** 观察在高脂高糖环境下,新型前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)抑制剂英克司兰对肾脏功能是否具有保护作用,利用蛋白组学技术预测其作用是否通过转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )通路,并研究其调控机制网络。**方法** 取36只健康雄性C57BL/6J小鼠,随机分为A组(正常对照,  $n=9$ ),B组(2型糖尿病模型,  $n=9$ ),C组(糖尿病模型+小剂量英克司兰,  $n=9$ )及D组(糖尿病模型+大剂量英克司兰,  $n=9$ ),其中B、C、D组均使用高脂饮食联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制备2型糖尿病模型,造模后3 d血糖持续大于16.7 mmol/L即为造模成功,造模后3 d C组、D组分别腹腔一次性注射英克司兰2 mg/kg及5 mg/kg,以成模后8周为实验观察终点。通过HE染色及PAS染色检测肾组织改变,检测血清标本中肌酐、低密度脂蛋白、胆固醇及PCSK9水平,检测24 h尿标本中尿蛋白/肌酐比值。在A、B、D组各选择4各小鼠肾组织样本进行转录组测序,筛选组间差异蛋白,综合KEGG、GO分析等分析评估英克司兰通过TGF- $\beta$ 起到对肾脏保护作用的可能性。**结果** 造模后,B、C、D组血糖、尿蛋白/肌酐比值、血肌酐、胆固醇等均明显高于A组,其中B组最高( $P<0.05$ );B、C、D组肾组织可见肾小管出现灶状小管细胞变性,系膜增生,B组肾小球增生指数明显高于其他各组。蛋白组学显示A-B组之间存在1 096种(579种上调,517种下调)差异蛋白,B-D组之间存在911种(475种上调,436种下调)差异蛋白,KEGG富集分析显示在A-B组、B-D组之间均可富集到TGF- $\beta$ 通路。B-D组之间有11种下调的差异蛋白(P45481: Crebbp, P70387: Hfe, Q61502: E2f5, Q62312: Tgfr2, Q62432: Smad2, Q8BSK8: Rps6kb1, Q8BUN5: Smad3, Q8CG19: Ltbp1, Q9CUN6: Smurf1, Q9JKX3: Tfr2, Q9Z1M4: Rps6kb2)与该通路相关。**结论** 英克司兰可能通过改善2型糖尿病小鼠血脂状况,抑制TGF- $\beta$ 通路活性,其作用机制可能与细胞外基质增生等效应有关。

**【关键词】** 前蛋白转化酶枯草溶菌素9 英克司兰 糖尿病肾病 转化生长因子 $\beta$  蛋白组学

## Study of the Protective Effect and Mechanism of Inclisiran on Renal Tissue in a Type 2 Diabetes Mouse Model via the Transforming Growth Factor- $\beta$ Pathway

LI Hongqian<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>2</sup>, XIANG Xin<sup>3</sup>, QI Ling<sup>1</sup>, ZHANG Dongmei<sup>1</sup>, TANG Yuhan<sup>1</sup>, ZHANG Liling<sup>1</sup>,  
OU Santao<sup>1</sup>, XUE Ling<sup>4</sup>, WU Weihua<sup>1</sup> $\Delta$ . 1. Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Provincial Clinical Research Center for Nephrology/Sichuan Provincial Key Laboratory of Metabolic Diseases, Luzhou 646000, China; 2. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 4. Department of Urology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Provincial Clinical Research Center for Nephrology, Luzhou 646000, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: 12390369@qq.com

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81200533), the Special Project of Hypertension of the Sichuan Medical Association (No. 2019TG01), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Project of Southwest Medical University (No. 202510632083).

**[Abstract] Objective** To investigate whether the novel proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitor Inclisiran exerts protective effects on the kidneys under high-glucose conditions, and to predict whether its mechanism involves the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway using proteomic techniques, while constructing

\* 国家自然科学基金(No. 81200533)、四川省医学会高血压项目专项(No. 2019TG01)及西南医科大学大创科研项目(No. 202510632083)资助

$\Delta$  通信作者, E-mail: 12390369@qq.com

its regulatory network. **Methods** Healthy male C57BL/6J mice were randomly assigned to four groups: Group A (control,  $n = 9$ ), Group B (diabetes model,  $n = 9$ ), Group C (diabetes + low-dose Inclisiran,  $n = 9$ ), and Group D (diabetes + high-dose Inclisiran,  $n = 9$ ). Groups B, C, and D were induced with type 2 diabetes using a high-fat diet combined with streptozotocin (STZ). Diabetes was confirmed by three consecutive days of fasting blood glucose levels  $> 16.7$  mmol/L after modeling. The experiment ended 8 weeks after modeling. Renal tissue changes were evaluated using hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) staining. Serum creatinine, low-density lipoprotein (LDL), cholesterol, and PCSK9 levels were measured, along with 24 h urinary protein-to-creatinine ratios. Renal tissue samples from Groups A, B, and D (4 mice per group) underwent transcriptomic sequencing to identify differentially expressed proteins. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) analyses were performed to assess the potential of Inclisiran to protect the kidneys via the TGF- $\beta$  pathway. **Results** After modeling, blood glucose, urine protein/creatinine ratio, blood creatinine, cholesterol, and other indicators in groups B, C, and D were significantly higher than those in group A, with group B showing the highest values ( $P < 0.05$ ). In the renal tissues of groups B, C, and D, focal tubular cell degeneration and mesangial proliferation were observed. The glomerular proliferation index in group B was significantly higher than in the other groups. Proteomics identified 1096 differentially expressed proteins (579 upregulated and 517 downregulated) between groups A and B, and 911 differentially expressed proteins (475 upregulated and 436 downregulated) between groups B and D. KEGG enrichment analysis showed that the TGF- $\beta$  pathway was enriched in both the A-B and B-D group comparisons. There were 11 downregulated differentially expressed proteins (P45481: Crebbp, P70387: Hfe, Q61502: E2f5, Q62312: Tgfb2, Q62432: Smad2, Q8BSK8: Rps6kb1, Q8BUN5: Smad3, Q8CG19: Ltbp1, Q9CUN6: Smurf1, Q9JKX3: Tfr2, Q9Z1M4: Rps6kb2) related to this pathway between groups B and D. **Conclusion** Inclisiran may improve the lipid profile of type 2 diabetic mice and reduce the activity of the TGF- $\beta$  pathway. Its mechanism of action may be related to effects such as extracellular matrix proliferation.

**[Key words]** Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9    Inclisiran    Diabetic kidney disease  
Transforming growth factor- $\beta$     Proteomics

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是常见的继发性肾脏疾病, 脂毒性是DKD重要的发病机制, 表现为胆固醇、LDL升高<sup>[1]</sup>。前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 是一种丝氨酸蛋白酶, 通过促进肝脏低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 的降解, 调节血液中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 与多种代谢性疾病中的高脂血症发生相。研究显示通过抑制该靶点对心脏大血管有较好保护作用, 但对肾脏在内的小血管保护作用尚不明显。而本项目组前期通过文献综述发现PCSK9有可能是多种代谢性肾脏疾病的潜在靶点<sup>[2]</sup>。转录生长因子 $\beta$ 是高脂参与糖尿病肾病发病的重要机制<sup>[3]</sup>。本研究拟制作小鼠2型糖尿病模型, 通过PCSK9新型抑制剂药物英克司兰干预, 观察药物干预对于糖尿病小鼠肾组织的保护作用, 并综合数据非依赖采集 (data independent acquisition, DIA) 蛋白组技术, 预测其作用机制, 为防治DKD提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型与分组

以微量白蛋白/肌酐比值为主要观察指标, 要满足 $\alpha=0.05$ 、 $1-\beta=80\%$ 的要求, 每组需至少6只小鼠, 考虑到造模过程中约15%的小鼠可能因血糖未达标或死亡被排除, 本实验最终确定每组样本量为9只, 4组共36只小鼠。

所有雄性C57BL/6J小鼠购于西南医科大学实验动物中心, 体质量20~22 g, 适应后喂养1周后, 将其随机分为A组 (正常对照,  $n=9$ )、B组 (糖尿病组,  $n=9$ )、C组 (糖尿病+小剂量英克司兰,  $n=9$ )及D组 (糖尿病+大剂量英克司兰,  $n=9$ )。其中B~D组使用商品化高脂饲料 (Research Diets D12492) 喂养6周后, 采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 索莱宝, 货号: S8050) 腹腔注射 (40 mg/kg连续注射5 d) 制备2型糖尿病小鼠模型, 尾静脉取血检测其血糖水平, 造模后连续3 d血糖大于16.7 mmol/L认为造模成功<sup>[4]</sup>。随后C组、D组分别腹腔一次性注射英克司兰2 mg/kg及5 mg/kg (购自MedChem Express公司, 货号: HY-143220)。每周检测各组体质量、尾静脉取血检测血糖, 以造模后8周作为实验观察终点处死各组小鼠。上述研究方案经西南医科大学实验动物伦理审核 (2022-0626-003)。在实验期间, A组采用常规饲料饲养。

### 1.2 标本取材及检测方案

各组小鼠于处死前进代谢笼收集24 h尿液标本, 戊巴比妥钠麻醉后经心脏提取全血标本, 经3000 r/min离心收集血清标本。同时取双侧肾脏, 称重后分别采取体积分数为10%多聚甲醛固定及 $-80$  °C冻存备用, 计算单侧肾脏的肾重指数 (肾重指数=该侧肾重/体质量 $\times 100\%$ ), 以左、右侧肾脏的肾重指数的平均数作为该小鼠的肾重指数。

血清样本经全自动生化分析仪(迈瑞BS-430 全自动生化分析仪)检测肌酐、低密度脂蛋白、胆固醇、转氨酶。血清采用ELISA检测(试剂盒购自:上海茁彩:ZC-55156)PCSK9水平。24 h尿标本采肌酐(Cr)测定试剂盒(南京建成: C011-2-1),尿蛋白检测试剂盒(南京建成: C035-2-1)检验方法均参考制造商产品说明书。采用HE染色及PAS染色观察肾组织改变,并采用课题组既往半定量分析方法<sup>[5]</sup>评估肾小球系膜增生情况。光学显微镜观察采用400倍镜显微镜观察,以系膜增生系数为评价指标(mesangial expansion index, MEI)。分为3级,定义如下:肾小球正常为0分;50%以上肾小球发生基质增生为1分;50%~70%肾小球发生基质增生为2分;75%~100%肾小球基质增生为3分。

### 1.3 蛋白组学分析方法

A、B、D组随机选择4只小鼠肾组织样本,通过timsTOF HT质谱仪,采用数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)的蛋白组学技术进行蛋白组学检测。样品提取总蛋白,取出一部分做蛋白浓度测定及SDS-PAGE检测,另取部分进行胰蛋白酶酶解,对酶解肽段除盐之后,对样品进行LC-MS/MS鉴定。LC-MS/MS鉴定采用DIA技术采集每个样品的质谱数据,进行谱图匹配、定量信息的提取。利用常见的多个数据库对鉴定的蛋白进行功能注释分析。定量结果经 $\log_2$ 转换后,采用Student's *t*-test 筛选差异表达蛋白(DEPs),筛选条件为: $P < 0.05$  (Benjamini-Hochberg校正)且 $|FC| \geq 2.0$ 。DEPs进一步通过DAVID工具进行GO功能注释(生物过程、细胞组分、分子功能)及KEGG通路富集分析( $P < 0.05$ )。本研究的原始数据对应于项目IPX0011464000及其子项目IPX0011464001,已存储于iProX平台,上传的数据文件大小为6.29 G。

### 1.4 统计学方法

将数据录入GraphPad Prism 8.0软件并分析。计量资料的表示采用 $\bar{x} \pm s$ ,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间两两比较采用SNK(Student-Newman-Keuls)检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般临床指标检测结果

造模成功后,B、C、D组血糖水平一直明显高于A组,造模后一周开始,D组血糖水平明显低于B组,造模后5周开始,C组血糖明显低于B组(均 $P < 0.05$ );造模后,B、C、D组体质量持续下降,A组体质量逐渐增加,但C、D组体质量一直高于A组,造模后1~3周,B组体质量明显高于

A组(均 $P < 0.05$ ),造模后8周,B组体质量轻度低于A、C、D组( $P < 0.05$ )(详见图1)。同时与A组比较,B、C、D组肾重指数、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、尿蛋白/肌酐比值显著高于A组,其中以B组最高( $P < 0.05$ ),A组与B组间丙氨酸转氨酶(ALT)水平差异无统计学意义,而C组、D组与B组间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(详见图2)。

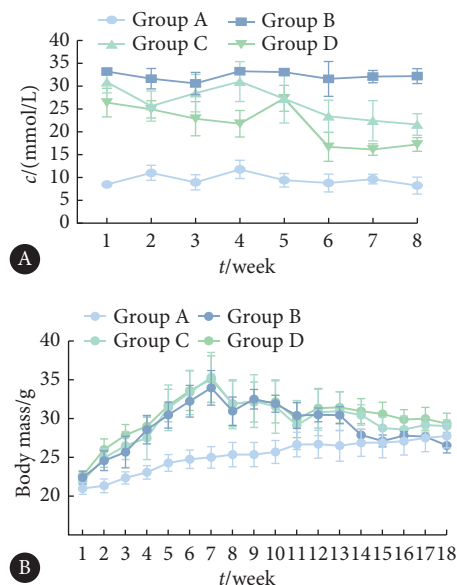


图1 各组小鼠血糖和体质量动态变化

Fig 1 Dynamic changes in blood glucose and body mass among groups of mice

Group A: control; Group B: diabetes model; Group C: diabetes + low-dose Inclisiran; Group D: diabetes + high-dose Inclisiran. A, Blood glucose levels of mice in each group after modeling; B, changes in body mass of mice in each group during the entire experiment (the type 2 diabetes model was established at 10 weeks).  $n = 9$ .

### 2.2 病理染色结果分析

在B、C、D组小鼠肾组织出现肾小球增大,轻度系膜细胞增生,小管细胞见空泡变性。其中B组更为明显。B、C、D组MEI指数显著高于A组,其中B组升高最为明显( $P < 0.05$ ),详见图3。

### 2.3 各组小鼠血清PCSK9的ELISA结果

B、C、D组血清中PCSK9水平显著高于A组( $P < 0.01$ ),C、D组PCSK9水平明显低于B组( $P < 0.01$ ),C、D组之间差异无统计学意义(详见表1)。

### 2.4 蛋白组学结果分析

#### 2.4.1 蛋白组学一般性分析结果

PCA主成分分析显示三组样本位于不同象限,总共鉴定除33 017个肽段,在B-A组之间检出1 096种DEPs(579种上调,517种下调),D-B组之间检出911种DEPs(475种上调,436种下调),D-A组之间检出1 067种DEPs(562种上调,505种下调)。59种DEPs在3个组别种均可见。详见网络资源附件附图1。

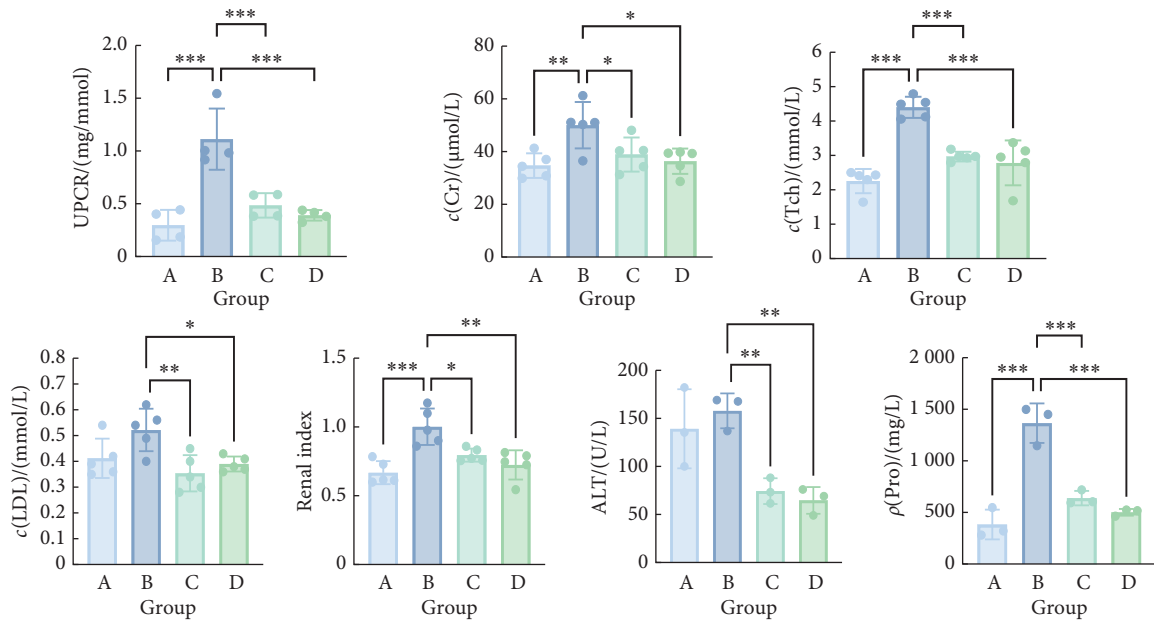


图 2 造模8周后各组小鼠生化指标

Fig 2 Biochemical results of mice in each group after 8 weeks of modeling

UPCR: urinary protein-to-creatinine ratio; Cr: serum creatinine; Tch: total cholesterol; LDL: low-density lipoprotein; ALT: alanine aminotransferase; Pro: urinary protein concentration. Group A: control; Group B: diabetes model; Group C: diabetes + low-dose Inclisiran; Group D: diabetes + high-dose Inclisiran.  $n = 9$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

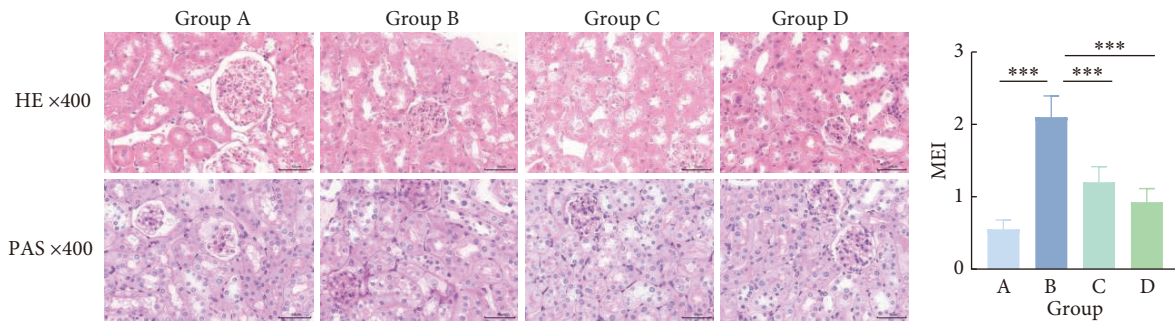


图 3 造模8周后各组小鼠肾组织病理染色结果

Fig 3 Histopathological staining results of kidney tissue in mice from each group after 8 weeks of modeling

Group A: control; Group B: diabetes model; Group C: diabetes + low-dose Inclisiran; Group D: diabetes + high-dose Inclisiran.  $n = 9$ . \*\*\*  $P < 0.001$ .

表 1 各组小鼠血清中PCSK9的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Changes in PCSK9 levels in mouse serum for each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	$\rho(\text{PCSK9})/(\text{pg/mL})$
A	9	764.510 ± 122.314
B	9	1036.293 ± 185.315**
C	9	809.659 ± 112.976**,#
D	9	852.397 ± 126.768**,#

Group A: control; Group B: diabetes model; Group C: diabetes + low-dose Inclisiran; Group D: diabetes + high-dose Inclisiran. \*\*  $P < 0.01$ , vs. Group A; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , vs. Group B.

### 2.4.2 D-B组蛋白互作网络图分析

为了解释英克司兰对肾脏的保护作用, 我们通过PPI网络分析B-D组间蛋白互作, 结果提示与TGF-β通路

相关的DEPs是英克司兰干预重要的蛋白互作, 其中Tgfr2(下调)、Ltp1(下调)、Smad3(下调)存在蛋白互作关系, 并可能与syk(下调)发生交联。KEGG富集分析显示TGF-β信号通路是D-B组之间富集到的重要信号通路, Crebbp、Hfe、E2f5、Tgfr2、Smad2、Rps6kb1、Smad3、Ltp1、Smurf1、Tfr2和Rps6kb2是该通路的DEPs。详见表2及网络资源附件附图2。

### 2.4.3 B、D组与A组分别的蛋白互作

通过KEGG富集分析显示B-A组之间差异蛋白富集在甘油酯代谢(glycerolipid metabolism)、花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)及细胞外基质-受体相互作用(ECM-receptor interaction)等通路, D-A组富集在

表 2 B-D组 KEGG富集分析获得的TGF- $\beta$ 通路、胆固醇代谢通路的差异表达蛋白Table 2 Differentially expressed proteins in the TGF- $\beta$  signaling pathway and cholesterol metabolism pathway identified by KEGG enrichment analysis in groups B-D

ID	Term	Differentially expressed proteins	P	ListHits
mmu04350	TGF- $\beta$ signaling pathway	P45481: Crebbp, P70387: Hfe, Q61502: E2f5, Q61502: E2f5, Q62432: Smad2, Q8BSK8: Rps6kb1, Q8BUN5: Smad3, Q9CUN6: Smurf1, Q9JKX3: Tfr2, Q9Z1M4: Rps6kb2	0.0103	11
mmu04979	Cholesterol metabolism	P33622: Apoc3, P55065: Pltp, Q61263: Soat1, Q8C142: Ldlrap1, Q9QY30: Abcb11, Q9R182: Angpt3	0.0235	6

糖胺聚糖降解(glycosaminoglycan degradation)、Notch通路等,可见TGF- $\beta$ 信号在两两比较中均可以看到。在PPI网络分析比较中,Smad2是均出现的关键蛋白。

#### 2.4.4 通过KEGG富集分析揭示D-B之间比较的脂质差异

由于英克司兰是一种靶向肝脏的降脂药,直接药理作用于调节胆固醇相关,在前述KEGG分析中,结果同样显示胆固醇代谢也是该药物影响肾脏重要的信号通路,可见Apoc3、Pltp、Soat1及Angptl3是富集到的该通路的DEPs。详见表2及网络资源附件附图3。

### 3 讨论

脂肪代谢紊乱是DKD重要发病机制。研究显示超过75%的2型糖尿病导致的DKD患者合并高脂血症,主要表现为甘油三酯、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白升高<sup>[6]</sup>。因此多数指南提示降脂治疗是DKD治疗的重要环节,目前主要是使用他汀类药物,但它并不能解决所有临床问题,甚至有研究提示在慢性肾脏病患者中使用他汀类药物,可能影响维生素K2代谢,可能增加患者发生血管钙化风险<sup>[7]</sup>,因此丰富针对DKD在内的慢性肾脏病患者降脂策略仍然是值得研究的问题。

PCSK9基因位于人类染色体1p32.3,编码含692个氨基酸的蛋白质<sup>[8]</sup>。近年来,针对PCSK9抑制剂已经比较广泛用于临床,通过靶向肝脏抑制循环PCSK9水平可以显著降低LDL水平。本研究使用的这类药物英克司兰是一种小分子SiRNA,可通过降解PCSK9 mRNA,延缓低密度脂蛋白受体(LDL-R)降解速度,LDL-R在肝细胞表面的表达增加,增强对低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的摄取和清除,降低血液中LDL-C水平<sup>[9-10]</sup>。既往对于该制剂的研究主要限于大血管,可以减少心血管疾病患者心脏骤停、非致命性心肌梗死(MI)和致命/非致命性中风等风险,但是对于小血管疾病血管并发症的保护证据比较缺乏。笔者推测这种大血管的获益,可能延续在类似DKD这种以小、微血管为主的代谢性血管并发症中,如

果能证实这一点,对于该人群的降脂选择可能带来新的思路。

既往研究也显示血清PCSK9增高的糖尿病患者具有更高的肾损害进展风险<sup>[11]</sup>,这与本研究模型所见血清PCSK9水平升高一致,ELISA所见高脂饮食升高动物模型血清PCSK9水平,可能与在高脂饮食状况下,脂质代谢紊乱相关,本实验药物干预所见结果,提示干预PCSK9可能改善尿蛋白、肾重等临床指标。在B、C、D组我们均看到小管出现变性,而在正常肾组织改变不明显,提示应归属DKD范畴,笔者推测高脂的使动因素可能在于脂质堆积并启动PCSK9对肾小管细胞的刺激,这在其他课题组的研究也有发现<sup>[12]</sup>,PCSK9可能作用于肾小管上皮细胞,产生肾小管上皮炎症过程,参与DKD发病机。因此,针对PCSK9治疗靶点,可能成为DKD防治有前景的靶点

首先,本研究在检测中选择了转氨酶作为检测指标,这是基于该药物作用的器官在肝脏,从结果看来在各组之间转氨酶未呈现显著差异,提示本研究的药物干预剂量未影响肝脏功能,该剂量也在参考了其他小组进行该药物用于小鼠的实验<sup>[12]</sup>,提示本研究使用的剂量在药物安全剂量以内。

本组实验动物实验周期尚短,模拟的是DKD早期变化,从本次蛋白组学结果来看,B-A组比较可看到DKD典型的细胞外基质增生正处于启动的状态,因此可看到细胞外基质蛋白互作、甘油酯代谢等一些通路的富集。TGF- $\beta$ 通路是两两比较均富集到的通路,且在D-B组之间多数DEPs出现下调,药物干预后通路呈现抑制表型。TGF- $\beta$ 通路通过配体与细胞膜上的丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合,激活胞内Smad蛋白磷酸化,形成复合物转入细胞核调控靶基因转录,具有信号级联放大、多效性及细胞微环境依赖性特点,广泛参与组织发育、免疫调节和纤维化等生理病理过程<sup>[13]</sup>。既往研究<sup>[8]</sup>发现高糖环境下该通路的激活,导致细胞外基质增生,促进肾间质纤维化和肾小球硬化,是DKD重要的治疗靶点。与其他研究<sup>[3]</sup>结果类似,基于PPI网络图、KEGG分析结果,本研究预测

PCSK9抑制剂可能通过该信号通路产生作用。

在TGF- $\beta$ 调控网络上,本研究发现的E2f5,该DEPs既往在前列腺研究较多,被认为促进Smad3磷酸化<sup>[14]</sup>。本研究发现的另一个DEPs为matn2,全称为基质连接蛋白2(Matrilin-2),TGF- $\beta$ 通路激活能促进Matrilin-2表达<sup>[15-16]</sup>。从该DEPs表型显示,matn2可能是在本研究中药物作用的重要细胞外基质蛋白之一,英克司兰干预可以通过抑制TGF- $\beta$ 通路激活,对肾组织带来额外保护作用。

从药理作用推测,PCSK9抑制剂和TGF- $\beta$ 通路之间应该是一种间接作用,因此本研究同时分析了该药物对肾组织内脂质的影响,从D-B组之间KEGG分析显示,药物可以下降肾组织内胆固醇代谢,可以看到出现Angptl3、APOC3、Soat1等DEPs出现,并呈现下调趋势,比如SILBERNAGEL等<sup>[17]</sup>研究显示包括Angptl3在内的标志物变化可能与糖尿病患者循环微炎症即心血管死亡风险相关,并且在其他类型的肾小球疾病中已揭示Angptl3可能与TGF- $\beta$ 存在正向调控作用<sup>[18]</sup>,通过敲除肾小球固有细胞Angptl3有可能抑制TGF- $\beta$ 信号通路,达到治疗作用。因此笔者推测药物干预减少了胆固醇等脂质在肾脏固有细胞的摄取,抑制了TGF- $\beta$ 通路的活化。

以往少量关于PCSK9与DKD关系的研究主要集中在肾小管细胞<sup>[12]</sup>,但单纯肾小管细胞变化难以解释本研究中出现的PCSK9抑制剂显著改善蛋白尿的情况。笔者推测使用英克司兰为代表的PCSK9抑制剂可能通过改善脂质代谢,通过TGF- $\beta$ 通路作用于细胞外基质增生等信号通路,改善DKD环境下的肾小球损伤,这一获益应是多靶点、多途径的。

本研究初步探讨了PCSK9抑制剂英克司兰对DKD动物模型的影响,提示该药品干预可能在DKD存在应用潜力,其机制可能与TGF- $\beta$ 通路相关。与传统的他汀类药物等传统降脂治疗相比,该药物使用更为方便,且不受肾功能影响。基于本研究结果,笔者有理由推测该药物可能对DKD具有独立的肾脏保护作用,而这一领域还未见系统报告。

当然本研究也存在一定局限性:(1)本研究将各组小鼠数量设置为9只,在实际的一般临床指标检测中发现结果呈正态分布,故本研究在组学检测部分减少了样本量,虽然从主成分分析显示3组样本呈现了明显的组间差异,但是不能否认上述结果可能存在一定偏倚;(2)现有的数据主要还是基于蛋白组学结果,缺乏相关的验证性实验,这也是本课题组正在进行的后续工作。本次研究结果仅初步证实该药物存在对2型糖尿病导致的DKD存在治疗作用,其机制可能与TGF- $\beta$ 信号相关,尚需更多验证性实

验探讨机制。

\* \* \*

**作者贡献声明** 李泓倩负责数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、软件、可视化和初稿写作,陈波负责研究项目管理、可视化和初稿写作,向馨负责数据审编、经费获取和调查研究,戚凌负责数据审编、正式分析和提供资源,张冬梅负责监督指导和验证,唐雨涵负责验证和可视化,张丽玲负责论文构思和验证,欧三桃负责研究项目管理、验证和审读与编辑写作,薛玲负责验证,吴蔚桦负责论文构思、数据审编、正式分析、经费获取、调查研究、研究项目管理、初稿写作和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

**Author Contribution** LI Hongqian is responsible for data curation, formal analysis, investigation, methodology, software, visualization, and writing--original draft. CHEN Bo is responsible for project administration, visualization, and writing--original draft. XIANG Xin is responsible for data curation, funding acquisition, and investigation. QI Ling is responsible for data curation, formal analysis, and resources. ZHANG Dongmei is responsible for supervision and validation. TANG Yuhuan is responsible for validation and visualization. ZHANG Liling is responsible for conceptualization and validation. OU Santao is responsible for project administration, validation, and writing--review and editing. XUE Ling is responsible for validation. WU Weihua is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, project administration, writing--original draft, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Declaration of Conflicting Interests** All authors declare no competing interests.

## 参 考 文 献

- [1] OPAZO-RÍOS L, MAS S, MARÍN-ROYO G, *et al.* Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2632. doi: 10.3390/ijms21072632.
- [2] LI H, QI L, ZHANG D, *et al.* PCSK9: Its role in lipid metabolism and as a novel target for the treatment of metabolic kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol*, 2025. doi: 10.2174/0115701611392964250918094721.
- [3] ZHENG W, QIAN C, XU F, *et al.* Fuxin Granules ameliorate diabetic nephropathy in db/db mice through TGF- $\beta$ 1/Smad and VEGF/VEGFR2 signaling pathways. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111806. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111806.
- [4] WU W H, ZHANG M P, ZHANG F, *et al.* The role of programmed cell death in streptozotocin-induced early diabetic nephropathy. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34(9): e296-301.
- [5] 吴蔚桦, 薛玲, 欧三桃, 等. 抑制 MST1 通路对糖尿病大鼠肾组织的保护作用及其机制研究. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(11): 835-841. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2015.11.006.  
WU W H, XUE L, OU S T, *et al.* Protective effect and mechanism of MST1 inhibition on kidney tissue in diabetic rats induced by streptozotocin. *Chinese Journal of Nephrology*, 2015, 31(11): 835-841. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2015.11.006.
- [6] PALAZHY S, VISWANATHAN V. Lipid Abnormalities in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Overt Nephropathy. *Diabetes Metab J*, 2017, 41(2): 128-134. doi: 10.4093/dmj.2017.41.2.128.

- [7] ZHELYAZKOVA-SAVOVA M D, YOTOV Y T, NIKOLOVA M N, *et al.* Statins, vascular calcification, and vitamin K-dependent proteins: Is there a relation? *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(7): 624-631. doi: 10.1002/kjm2.12373.
- [8] MELENDEZ Q M, KRISHNAJI S T, WOOTEN C J, *et al.* Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 625-626: 39-53. doi: 10.1016/j.abb.2017.06.001.
- [9] KONG N, XU Q, CUI W, *et al.* PCSK9 inhibitor inclisiran for treating atherosclerosis via regulation of endothelial cell pyroptosis. *Ann Transl Med*, 2022, 10(22): 1205. doi: 10.21037/atm-22-4652.
- [10] RAY K K, WRIGHT R S, KALLEND D, *et al.* Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1507-1519. doi: 10.1056/NEJMoa1912387.
- [11] FENG Z, LIAO X, ZHANG H, *et al.* Increased serum PCSK9 levels are associated with renal function impairment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2215880. doi: 10.1080/0886022X.2023.2215880.
- [12] FENG Z, LIAO X, PENG J, *et al.* PCSK9 causes inflammation and cGAS/STING pathway activation in diabetic nephropathy. *FASEB J*, 2023, 37(9): e23127. doi: 10.1096/fj.202300342RRR.
- [13] 王一帆, 郭建波, 邵宝怡, 等. TGF- $\beta$ 1/SMAD 在糖尿病肾病中的作用机制与研究进展. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(6): 1065-1073. doi: 10.12182/20231160108.  
WANG Y F, GUO J B, SHAO B Y, *et al.* The role of TGF- $\beta$ 1/SMAD in diabetic nephropathy: Mechanisms and research development. *J Sichuan Univ ( Med Sci )*, 2023, 54(6): 1065-1073. doi: 10.12182/20231160108.
- [14] MAJUMDER S, BHOWAL A, BASU S, *et al.* Deregulated E2F5/p38/SMAD3 Circuitry Reinforces the Pro-Tumorigenic Switch of TGF $\beta$  Signaling in Prostate Cancer. *J Cell Physiol*, 2016, 231(11): 2482-2492. doi: 10.1002/jcp.25361.
- [15] DEÁK F, MÁTÉS L, KORPOS E, *et al.* Extracellular deposition of matrilin-2 controls the timing of the myogenic program during muscle regeneration. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 15): 3240-3256. doi: 10.1242/jcs.141556.
- [16] ZHANG S, ZHANG M, HUANG H, *et al.* High glucose-induced Matrilin-2 expression in mouse mesangial cells was mediated by transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(2): 303-308. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.091.
- [17] SILBERNAGEL G, CHEN Y Q, LI H, *et al.* Associations of Circulating ANGPTL3, C-Terminal Domain-Containing ANGPTL4, and ANGPTL3/8 and ANGPTL4/8 Complexes with LPL Activity, Diabetes, Inflammation, and Cardiovascular Mortality. *Circulation*, 2025, 151(3): 218-234. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.124.069272.
- [18] JI B, LIU J, MA Y, *et al.* Minnelide combined with Angptl3 knockout completely protects mice with adriamycin nephropathy via suppression of TGF- $\beta$ 1-Smad2 and p53 pathways. *Int Immunopharmacol*, 2023, 115: 109656. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109656.

(2025-05-10 收稿, 2025-12-08 修回)

编辑 汤洁



**开放获取** 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

**OPEN ACCESS** This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2026 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*