

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.10.016

温阳活血利水方含药血清对足细胞组织蛋白酶 L、发动蛋白以及微丝、微管的影响

陈凤, 王相相, 邱雯雯, 袁军*

(湖北中医药大学, 湖北省武汉市武昌区昙华林 188 号, 430061)

摘要 目的 探讨温阳活血利水方治疗原发性肾病综合征蛋白尿的可能作用机制。方法 将足细胞分为正常对照组、模型组、地塞米松组、10% 中药血清组、20% 中药血清组、空白对照组。除正常对照组、空白对照组外, 其余各组用氨基核苷嘌呤霉素粉剂制备足细胞损伤模型。正常对照组和模型组加入完全培养基 5 ml, 地塞米松组加入 392 $\mu\text{g/L}$ 地塞米松 5 ml, 10% 中药血清组、20% 中药血清组、空白对照组分别加入 10% 中药血清、20% 中药血清、空白对照血清各 5 ml。RT-PCR 法与 Western blot 分别检测各组足细胞胞浆组织蛋白酶 L (CatL)、发动蛋白 mRNA 和蛋白表达含量, 并用激光共聚焦观察各组中足细胞骨架微丝、微管的形态结构变化。结果 与正常组比较, 模型组 CatL mRNA 与蛋白含量升高, 发动蛋白表达含量降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各中药血清组与地塞米松组 CatL mRNA 与蛋白表达含量降低, 足细胞发动蛋白蛋白表达含量升高 ($P < 0.01$); 与 10% 中药血清组比较, 20% 中药血清组 CatL mRNA 与蛋白表达含量降低, 发动蛋白表达含量升高 ($P < 0.01$)。各组间足细胞发动蛋白 mRNA 表达含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 温阳活血利水方可能通过下调足细胞 CatL 的表达, 减少 CatL 对发动蛋白的酶解, 从而稳定细胞骨架中的微丝、微管等结构, 减少足突融合, 改善蛋白尿。

关键词 原发性肾病综合征; 蛋白尿; 温阳活血利水方; 组织蛋白酶 L; 足细胞; 发动蛋白; 细胞微丝

蛋白尿是原发性肾病综合征症状之一, 它往往与肾小球滤过屏障受损相关^[1]。足细胞作为肾小球滤过屏障结构的重要组成部分, 如果其结构的完整性和形态的稳定性遭到破坏, 就会形成蛋白尿。足细胞骨架是足细胞得以正常发挥功能的重要结构基础, 包括微丝、微管和中间丝^[2]。足细胞胞浆组织蛋白酶 L (cathepsin L, CatL) 蛋白水解途径参与了足突骨架蛋白的调控, 在多种原因引起的蛋白尿中发挥了重要作用^[3-4], 其途径之一是通过裂解其底物足细胞发动蛋白和突触孔蛋白实现对细胞骨架肌动蛋白的调控^[5]。我们前期研究证实, 温阳活血利水法能明显改善肾病综合征蛋白尿, 其可能机制与降低足细胞 CatL 水平, 增加突触孔蛋白表达, 从而逆转足细胞骨架微丝的重构, 维持足细胞骨架结构稳定有关^[6-9]。足细胞损伤后, CatL 另一底物足细胞发动蛋白水平变化以及温阳活血利水法对其的影响尚不清楚。对此, 我们进行了进一

步研究。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

SPF 级 SD 大鼠 20 只, 体重 200 ~ 220 g, 2 月龄, 实验动物许可证号: SCXK (鄂) 2014-0004, 于湖北中医药大学实验动物中心饲养。小鼠永生足细胞 (MPC5) 为湖北省人民医院丁国华教授赠送。

1.2 药品

温阳活血利水方由附子 10 g、鹿角胶 10 g、麻黄 6 g、肉桂 5 g、黄芪 30 g、川芎 10 g、红花 5 g、牛膝 10 g、益母草 10 g、猪苓 10 g、水蛭 3 g 组成, 应用配方颗粒剂 (江阴天江药业有限公司, 批号 1511120) 进行配制, 按体表面积法计算大鼠给药的等效剂量, 再以超纯水冲化成浓度为 2 g/ml 混悬液。地塞米松磷酸钠注射液购于湖北天药药业股份有限公司 (规格: 1 ml : 5 mg, 国药准字 H42020019)。

1.3 主要试剂和仪器

氨基核苷嘌呤霉素粉剂 (Amresco 公司, 批号: J593-25MG), 胎牛血清 (FBS, GIBCO 公司,

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药中西医结合科研项目

* 通讯作者: 18986225252@126.com

批号: 457583745), 重组小鼠 γ -干扰素 (IFN- γ , PEPRO TECH 公司, 批号: 315-05), Trizol 试剂盒 (批号: G3013)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (批号: 170923)、4% 多聚甲醛 (批号: G1101)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: G2026) 均为武汉谷歌生物科技公司产品, β -tubulin 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号: ab6160)、兔抗大鼠 CatL 多克隆抗体 (批号: ab58991)、兔抗大鼠发动蛋白多克隆抗体 (批号: ab3457) 均为美国 Abcam 公司产品, 鬼笔环肽 (Sigma 公司, 批号: P5282), SDS (Sigma 公司, 批号: 98364), Triton X-100 (Solarbio 公司, 批号: 112938), 含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZLI-9557), AMV 逆转录酶 (Promega 公司, 批号: A8460-300), PCR 试剂盒 (ROCHE 公司, 批号: 4913914001), 10% 水合氯醛 (上海展云化工有限公司, 批号: 1408037), CY3 标记山羊抗兔 (1:1000, Aekson 公司, 批号: 555676), 引物由 Invitrogen Biotechnology Co. LTD 公司合成。激光共聚焦显微镜 (德国莱卡公司, 型号: Leica-LCS-SP2), 荧光定量 PCR 仪 (罗氏公司, 型号: 480), CO₂ 恒温培养箱 (日本三洋公司, 型号: MCO-15AC)。

1.4 含药血清的制备

大鼠适应性喂养 3 天, 采用随机数字表分为温阳活血利水方组 15 只和空白血清组 5 只。温阳活血利水方组灌服温阳活血利水方混悬液, 空白血清组灌服生理盐水。两组均早晚各灌胃 1 次, 每次 3 ml, 给药 7 天。最后一次给药 1 h 后, 用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 经腹腔注射进行麻醉, 无菌条件下打开腹腔做血管分离手术, 使腹主动脉充分暴露。采集血样, 室温静置 1 h, 再放于冰箱中 4℃ 冷藏 4 h, 待血液凝固、血块收缩后 3000 r/min 离心 15 min, 收集血清至灭菌的离心管中, 水浴锅 56℃ 灭活补体 30 min, 过滤除菌后用封口膜密封, -80℃ 冻存备用。

1.5 细胞培养、分组及给药

参考文献 [10] 进行足细胞的培养与诱导分化。复苏后的足细胞置于含有 104 U/ml 重组小鼠 IFN- γ 的 33℃ 足细胞完全培养基、涂有 10 mg/L 的 I 型胶原的 25 cm² 细胞培养瓶中, 置于 33℃ 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞增殖状态良好的情况下, 将 CO₂ 恒温培养箱条件调至 37℃、5% CO₂ 的状态, 更换培养瓶中的细胞培养基为 IFN- γ 干扰素的 37℃ 足细胞完全培养基继续培养, 大约 10 ~

14 天足细胞分化至成熟状态, 呈星形多突状, 即可作为此次实验用细胞。

将足细胞分为正常对照组、模型组、地塞米松组、10% 中药血清组、20% 中药血清组、空白对照组 6 组。细胞同步化后, 将正常对照组与空白对照组的细胞更换培养液为 37℃ 足细胞完全培养基, 模型组、地塞米松组、10% 中药血清组、20% 中药血清组分别加入以 37℃ 足细胞完全培养基配制的氨基核苷嘌呤霉素干预液 (45 mg/L), 37℃、5% CO₂ 条件下孵育, 12 h 后将嘌呤霉素干预液取出。模型组加入 37℃ 足细胞完全培养基 5 ml, 地塞米松组加入 37℃ 足细胞完全培养基配制的浓度为 392 μ g/L 的地塞米松 5 ml, 10% 中药血清组、20% 中药血清组、空白对照组分别加入相应的 37℃ 足细胞完全培养基配制培养液 10% 中药血清、20% 中药血清、空白对照血清各 5 ml, 培养 24 h, 备用, 每组实验细胞培养重复 5 次。

1.6 观察指标和方法

1.6.1 发动蛋白、CatL mRNA 表达 用实时定量 PCR 法检测。培养瓶中加入 1 ml Trizol, 破碎细胞, RNA 抽提参照 Trizol 试剂盒方法进行。用 AMV 逆转录酶进行逆转录合成 cDNA。再以此 cDNA 为模板按 PCR 试剂盒说明进行实时 PCR 反应。反应体系如下: 2 $\times$ qPCR 混合物 12.5 μ mol/L、7.5 μ M 引物 2.0 μ l、反转录产物 2.5 μ l、ddH₂O 8.0 μ l。引物序列: β -actin, 正链 5'-GTGACGTTGACATCCG-TAAAGA-3', 反链 5'-GTAACAGTCCGCCTAGAAG-CAC-3', 287 bp; CatL, 正链 5'-CTACCGCCAC-CAGAAGCACA-3', 反链 5'-CTAAACGCCCAA-CAAGACCC-3', 144 bp; 发动蛋白, 正链 5'-CTGC-CCGAGAACAGCGAGAT-3', 反链 5'-GCATTACTGC-CTTTGGGACAC-3', 105 bp。反应程序如下: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 40 个循环。目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-[目的基因Ct - 内参Ct]}$, 其中 Ct 代表循环阈值。

1.6.2 发动蛋白、CatL 蛋白表达 用 Western blot 法检测。培养瓶加入 400 μ l 的 RIPA 裂解液 (使用前 5 min 内加入蛋白酶抑制剂) 作用 5 min。收集裂解液到 1.5 ml 离心管中, 冰浴 30 min, 12000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, 蛋白含量按 BCA 试剂盒测定。取总蛋白 10 μ l 经 SDS 凝胶电泳后, 转移至 PVDF 膜上。封闭和洗膜后, 加入稀释一抗 (1:500) 孵育过夜, 洗膜后加入二抗孵育, 化学发光法进行显色, 将胶片进行扫描存档, Alpha 软件处理系统 (4.0 版本) 分析目标带

的光密度值。以 actin 作为内参。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / actin 灰度值。

1.6.3 激光共聚焦显微镜下观察足细胞微丝、微管 细胞爬片进行 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 (4℃, 0.5h), PBS 清洗, 0.5% Triton X-100 (室温 15 min) PBS 清洗, 加 FITC 鬼笔环肽染色剂工作液 (0.01 mg/ml) 与兔抗 β -tubulin (1 : 1000) 4℃ 孵育 24 h, PBS 清洗, CY3 标记山羊抗兔 (1 : 1000) 加入孔内, 覆盖到爬片圈内细胞, 避光室温孵育 50 min, PBS 清洗, 用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片, 于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, 首先进行方差齐性检验, 方差齐时两两组间比较用 LSD- t 检验, 方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。

2 结果

2.1 各组足细胞发动蛋白、CatL mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 模型组 CatL mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 10%、20% 中药血清组及地塞米松组 CatL mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 各干预组足细胞 CatL mRNA 表达仍较正常组高 ($P < 0.01$); 10%、20% 中药血清组与地塞米松组 CatL mRNA 表达比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 中药血清组 CatL mRNA 表达高于 20% 中药血清组 ($P < 0.01$); 空白对照组与正常对照组 CatL mRNA 表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组间细胞发动蛋白 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组足细胞发动蛋白、CatL mRNA 表达比较 ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CatL	发动蛋白
正常对照组	5	1.01 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.18
模型组	5	1.77 $\pm$ 0.43*	1.07 $\pm$ 0.29
地塞米松组	5	1.25 $\pm$ 0.19* Δ	1.02 $\pm$ 0.33
10% 中药血清组	5	1.45 $\pm$ 0.18* Δ	1.11 $\pm$ 0.30
20% 中药血清组	5	1.26 $\pm$ 0.13* Δ #	1.03 $\pm$ 0.17
空白对照组	5	1.08 $\pm$ 0.30	1.08 $\pm$ 0.34

注: CatL, 组织蛋白酶 L; 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 10% 中药血清组比较, # $P < 0.01$

2.2 各组足细胞发动蛋白、CatL 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组 CatL 蛋白表达升高, 发动蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 10%、20% 中药血清组及地塞米松组足细胞 CatL 蛋白表达降低, 发动蛋白表达升高

($P < 0.01$); 各干预组 CatL 蛋白、发动蛋白表达与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与地塞米松组比较, 10%、20% 中药血清组 CatL 蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 10% 中药血清组足细胞发动蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 20% 中药血清组足细胞发动蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 中药血清组 CatL 蛋白表达高于 20% 中药血清组, 发动蛋白表达低于 20% 中药血清组 ($P < 0.01$); 空白对照组 CatL、发动蛋白表达量与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组 CatL 与发动蛋白电泳图见图 1。

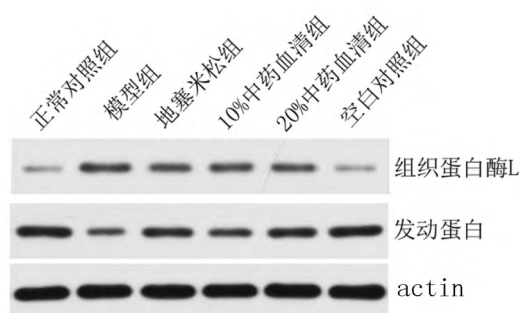


图 1 各组足细胞组织蛋白酶 L 与发动蛋白电泳图

表 2 各组足细胞发动蛋白、CatL 蛋白表达量比较 ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CatL	发动蛋白
正常对照组	5	0.12 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.04
模型组	5	0.52 $\pm$ 0.02*	0.25 $\pm$ 0.03*
地塞米松组	5	0.32 $\pm$ 0.03* Δ	0.55 $\pm$ 0.03* Δ
10% 中药血清组	5	0.35 $\pm$ 0.03* Δ	0.37 $\pm$ 0.23* Δ ▲
20% 中药血清组	5	0.29 $\pm$ 0.05* Δ #	0.55 $\pm$ 0.04* Δ #
空白对照组	5	0.12 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.04

注: CatL, 组织蛋白酶 L; 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与地塞米松组比较, ▲ $P < 0.01$; 与 10% 中药血清组比较, # $P < 0.01$

2.3 各组足细胞骨架微丝、微管的免疫荧光染色激光共聚焦结果

与正常对照组相比, 模型组足细胞胞体缩小、足突回缩, 细胞骨架结构微丝形成的张力纤维出现了由协调有序的平行排列模式重组变成了紊乱无序的放射网状结构、微丝数量减少, 并且趋于边缘化形成核外环, 与此同时细胞骨架结构微管出现了数量减少、解聚、排列紊乱, 但在足细胞初级突起处分布数量有所增加。各中药血清组和地塞米松组均可以观察到足细胞胞体回缩、肌动蛋白纤维重构、微管结构的减少与排列紊乱较模型组均有了一定程度的恢复, 出现了肌动蛋白和微管蛋白的重新聚

合、网状肌动蛋白纤维结构减少、足突重新伸展等一系列修复足细胞损伤的现象。空白对照组较之正常对照组则未见到细胞骨架微丝、微管结构的明显改变。

3 讨论

原发性肾病综合征以脾肾阳虚为本，水湿、瘀血为标。《血证论·遗精》曰“病血者未尝不病水，病水者，亦未尝不病血也”，说明两者相互为患。湿为阴邪易伤阳气，进一步加重脾肾之阳虚，阳虚、水湿、瘀血三者相互影响，使本病迁延难愈易复发。肾病综合征治疗当温阳活血利水，该治法既针对脾肾阳虚的本因，又兼顾了水湿、瘀血的病理产物，标本兼顾，虚实同治。

肾病综合征病理常常表现为肾小球中足细胞足突融合^[1]。足细胞骨架蛋白结构的变化是足突融合发生的先决条件，构成足细胞骨架结构的各种蛋白纤维丝重新排列是引起细胞结构变化、足突融合发生的分子基础^[1]。本实验中嘌呤霉素与足细胞共孵育后，足细胞微丝、微管形态结构出现紊乱。然而受损足细胞具有很强的恢复能力，当有害因素去除后，它们有能力恢复重组的肌动蛋白骨架和逆转足突融合的状况^[11-12]。地塞米松作为此次实验的阳性对照药物，其对足细胞形态、骨架蛋白结构改善作用已经得到了充分证实^[13-14]。本研究结果显示，地塞米松同样减轻了足细胞损伤。在温阳活血利水方作用下，足细胞形态与骨架出现了和地塞米松组相同趋势的变化。

足细胞细胞质内 CatL 水解相关底物的途径参与了足细胞骨架蛋白及相关蛋白的调控^[15]。在伴有蛋白尿的人类肾脏疾病和动物肾病模型中，CatL 的表达较之正常对照组均有显著上升^[5, 16-17]。前期实验表明，该方可改善足细胞损伤后 CatL 的表达增加及其水解底物突触孔蛋白的表达减少，从而有助于稳定足细胞肌动蛋白骨架，减少足突融合，改善蛋白尿^[8]。CatL 亦可以通过对其水解底物之一的发动蛋白的裂解作用对足细胞肌动蛋白骨架进行调控^[5, 18]。在脂多糖和嘌呤霉素诱导损伤的蛋白尿动物模型中，CatL mRNA 与蛋白水平均增加，发动蛋白则减少^[9]。本研究结果显示，嘌呤霉素诱导损伤后的足细胞与正常足细胞发动蛋白 mRNA 表达无差异，提示模型组足细胞发动蛋白水平下降并非由于转录减少，而可能与足细胞损伤后 CatL 表达升高，对发动蛋白的酶解增强所致。

本研究结果亦显示，各给药组均能降低 CatL

mRNA 与蛋白，升高发动蛋白表达，且与模型组、正常组差异均有统计学意义，提示各给药组均有一定疗效，但均未恢复到正常水平。在降低 CatL mRNA 与蛋白方面，10%、18% 中药血清组与地塞米松组相当。20% 中药血清组在降低 CatL mRNA 与蛋白优于 10% 中药血清组；在升高发动蛋白表达上，地塞米松组及 20% 中药血清组优于 10% 中药血清组，且 20% 中药血清组与地塞米松组相当，提示 20% 中药血清组能更好地减少 CatL 对足细胞发动蛋白的酶解，降低蛋白尿。

微丝是由肌动蛋白分子螺旋状聚合成的纤丝。组装的发动蛋白可以与短的肌动蛋白纤维直接交互作用，促使肌动蛋白聚合^[20]。因此，发动蛋白的减少会影响到微丝的结构；同样，发动蛋白的缺失会导致微管蛋白乙酰化水平急剧增加，不利于微管的形成^[19]。本研究结果显示，温阳活血利水方抑制了 CatL 对发动蛋白的酶解，减轻了微管蛋白的破坏，保护发动蛋白与微丝结构的良性互动，维持肾小球滤过屏障保持完整，减少蛋白尿。

综上所述，温阳活血利水方含药血清可能通过下调损伤足细胞 CatL 的表达而减少 CatL 对足细胞发动蛋白的酶解，从而保护足细胞细胞骨架中的微丝、微管等结构，维持足细胞的正常形态，使蛋白尿得以改善。

参考文献

- [1] WELSH GI, SALEEM MA. The podocyte cytoskeleton-key to a functioning glomerulus in health and disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 8(1): 14-21.
- [2] 谢朝晖, 陈兰英. 细胞骨架研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(4): 315-318.
- [3] KISTLER AD, PEEV V, FORST AL, et al. Enzymatic disease of the podocyte [J]. Pediatr Nephrol, 2010, 25(6): 1017-1023.
- [4] MUNDEL P, REISER J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte [J]. Kidney Int, 2010, 77(7): 571-580.
- [5] SEVER S, ALTINTAS MM, NANKOE SR, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease [J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2095-2104.
- [6] 袁军, 鲁艳芳, 黄琼霞, 等. 温阳活血利水方对阿霉素肾病大鼠肾小球足细胞 podocin 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(6): 492-495.
- [7] 袁军, 鲁艳芳, 黄琼霞, 等. 温阳活血利水方对阿霉素肾病大鼠肾小球足细胞 nephrin 表达的影响 [J]. 临床肾脏病杂志, 2012, 12(6): 281-285.

- 袁军, 杨柳, 肖浪, 等. 温阳活血利水方对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞 CD₂ AP、synatopodin、 α -actinin-4 表达的影响 [J]. 光明中医, 2013, 28(10): 2041-2045.
- 邱雯雯, 袁军, 杨柳. 温阳活血利水方含药血清对嘌呤霉素损伤小鼠永生系足细胞组织蛋白酶 L 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(5): 602-607.
- [10] YUAN H, REN ZL, HU FQ, et al. Renin induces apoptosis in podocytes through a receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanism [J]. Am J Med Sci. 2012, 344(6): 441-446.
- [11] SHIRATO I, SAKAI T, KIMURA K, et al. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis [J]. Am J Pathol, 1996, 148(4): 1283-1296.
- [12] TIAN X, ISHIBE S. Targeting the podocyte cytoskeleton: from pathogenesis to therapy in proteinuric kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(10): 1577-1583.
- [13] 吴汪丽, 于力, 张瑶, 等. Bad 在地塞米松抑制嘌呤霉素诱导足细胞凋亡中的表达及意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(11): 856-858.
- [14] RANSOM RF, LAM NG, HALLET MA, et al. Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization [J]. Kidney Int. 2005, 68(6): 2473-2483.
- [15] CHUANG PY, HE JC. Signaling in regulation of podocyte phenotypes [J]. Nephron Physiol, 2009, 111(2): p9-p15.
- [16] FAUL C, DONNELLY M, MERSCHER-GOMEZ S, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A [J]. Nat Med, 2008, 14(9): 931-938.
- [17] REISER J, OH J, SHIRATO I, et al. Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin [J]. J Biol Chem, 2004, 279(33): 34827-34832.
- [18] GU C, YADDANAPIDI S, WEINS A, et al. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton [J]. EMBO J, 2010, 29(21): 3593-3606.
- [19] FERGUSON SM, DE CAMILLI P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(2): 75-88.

Effect of Serum Containing *Wenyang Huoxue Lishui Formula* (温阳活血利水方) on Podocytes Cathepsin L, Dynamin, Microfilament and Microtubule

CHEN Feng, WANG Xiangxiang, QIU Wenwen, YUAN Jun

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430061)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Wenyang Huoxue Lishui Formula* (warming yang, activating blood circulation, promoting urination decoction, 温阳活血利水方) in treating proteinuria of primary nephrotic syndrome. **Methods** Mouse podocytes were divided into normal control group, model group, dexamethasone group, 10% Chinese medicine serum group, 20% Chinese medicine serum group, and blank control group. Except for normal control group, blank control group, the other groups were given puromycin aminonucleoside powder to induce podocytes injury model. The normal control group and model group were added 5ml, and dexamethasone group was added 5ml dexamethasone 392 μ g/L. 10% Chinese medicine serum group, 20% Chinese medicine serum group, and blank control group were added 5 ml 10% Chinese medicine serum, 20% Chinese medicine serum and blank control serum respectively. RT-PCR and Western blot were used to detect the protein expression of cathepsin L (CatL) and dynamin mRNA, and laser confocal was applied to observe the morphological and structural changes of microfilaments and microtubules in the podocytes of each group. **Results** Compared with the normal group, the mRNA and protein expression of CatL of model group increased and the protein expression of dynamin decreased (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression of CatL in Chinese medicine serum groups and dexamethasone group decreased, and the expression of dynamin was increased (all $P < 0.01$). Compared with the treatment with the serum contained 10% Chinese medicine, the mRNA and protein expression of CatL were lower and the protein expression of dynamin was higher by treatment with the serum contained 20% Chinese medicine ($P < 0.01$). There was no significant difference in the relative expression of dynamin mRNA among the groups ($P > 0.05$). **Conclusion** *Wenyang Huoxue Lishui Formula* can reduce CatL's enzymolysis of dynamin through reducing CatL expression in podocytes, so as to stabilize microfilaments, microtubules and other structures in the cytoskeleton, reduce fusion of podocytic process and improve proteinuria.

Keywords primary nephrotic syndrome; proteinuria; *Wenyang Huoxue Lishui Formula* (温阳活血利水方); cathepsin L; podocyte; dynamin; microfilament

(收稿日期: 2017-08-29; 修回日期: 2018-01-06)

编辑: 王利芬