

文章编号:1001-6880(2016)12-1886-05

化瘀通络中药对高糖刺激下足细胞裂孔膜蛋白的干预作用

方敬¹,陈志强^{2*},王月华³,张江华⁴,李黎莉⁵

¹河北中医学院基础医学院,石家庄 050200; ²河北省中医院肾内科,石家庄 050017; ³河北医科大学第三医院肾内科,石家庄 050011; ⁴河北医科大学中西医结合学院,石家庄 050017; ⁵阳光融合医院肾内科,潍坊 261000

摘要:通过化瘀通络中药对 H-2Kb-tsA58 条件性永生化小鼠足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 表达的干预作用,探讨化瘀通络中药降低糖尿病肾病蛋白尿、保护肾功能的可能作用机制。实验以体外培养小鼠足细胞为研究对象,将其分为正常糖组(CG)、高糖组(HG)、高糖加药组(HG+Z),通过免疫细胞化学(ICC)、蛋白质印迹法(Western-Blot)、实时荧光定量(Real-time PCR)方法检测不同时间点不同干预后各组 podocin、CD2AP 蛋白及基因的表达情况。结果显示干预足细胞 48 h 后,与 CG 组比较,其余两组 podocin、CD2AP 两种蛋白表达量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 HG 组比较,(HG+Z)组两种蛋白表达量均明显升高($P < 0.05$)。与同时间点 CG 组比较,其余两组 podocin、CD2AP mRNA 表达均显著降低($P < 0.01$);与同时间点 HG 组比较,(HG+Z)组 48 h 两种蛋白的基因表达量均明显升高($P < 0.01$),24,72 h 与同时间点 HG 组无明显差异($P > 0.05$)。以上结果说明化瘀通络中药可以上调高糖刺激下足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 的表达,其可能为化瘀通络中药减少糖尿病肾病蛋白尿、保护肾功能的作用机制之一。

关键词:化瘀通络中药;足细胞裂孔膜蛋白;podocin;CD2AP

中图分类号:R255.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.006

The Effect of Huayu Tongluo Traditional Chinese Medicine on Expression of Podocin, CD2AP under High Glucose Stimulating

FANG Jing¹, CHEN Zhi-qiang^{2*}, WANG Yue-hua³, ZHANG Jiang-hua⁴, LI Li-li⁵

¹Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; ²Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China; ³Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; ⁴Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ⁵Sunshine Hospital, Weifang 261000, China

Abstract: To explore the possible mechanism of Huayu Tongluo traditional Chinese medicine in reducing proteinuria and protecting renal function of diabetic nephropathy on expression of podocin, CD2AP in the conditionally immortalized mouse podocytes. The conditionally immortalized mouse podocytes were selected as the research object. These podocytes cultured under the growth permissive condition were divided into the normal glucose group (CG group), high glucose group (HG group) and high glucose dosing group (HG + Z group) and intervened for 24 h, 48 h and 72 hours. The expression of podocin and CD2AP was detected by ICC, Western-blot and Real-Time PCR. It was observed that at 48 hours, compared with CG group, the expression of podocin and CD2AP protein in HG and (HG + Z) groups was lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with HG group, the expression of podocin and CD2AP protein in (HG + Z) group was higher ($P < 0.05$). Compared with CG group, at same time point, the expression of podocin and CD2AP mRNA in other groups was lower ($P < 0.01$). Compared with HG group, only at 48 hours, the expression of podocin and CD2AP mRNA in (HG + Z) group was higher ($P < 0.01$). The results indicated that Huayu Tongluo traditional Chinese medicine can increase the expression of membrane protein podocin, CD2AP and it may be one of the mechanisms on reducing diabetic nephropathy proteinuria and protecting renal function.

Key words: Huayu Tongluo Chinese herbs; slit diaphragm protein; podocin; CD2AP

生的病理基础。参与构成肾小球滤过屏障最外层的足细胞是一种高度特异性的终末期分化细胞,对蛋白质的滤过起着举足轻重的作用,而高糖环境又为导致足细胞损伤及(或)死亡的重要原因之一。在本课题前期实验通过复制 DN 大鼠动物模型发现化瘀通络中药能够明显减轻 DN 大鼠的尿蛋白排泄,延缓肾脏损害的作用^[1,2]。为进一步探讨化瘀通络中药的作用机制,实验拟以体外培养的小鼠永生系足细胞为切入点,从细胞水平进一步探讨化瘀通络中药对足细胞相关蛋白 podocin、CD2AP 表达的影响,以探讨化瘀通络中药减少 DN 蛋白尿、保护肾脏的可能作用靶点。

1 材料与仪器

1.1 动物与细胞

清洁级健康雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠 10 只,5~6 周龄,体重 200~220 g,河北医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(冀)2013-1-003。

H-2Kb-tsA58 条件性永生化小鼠足细胞由河北医科大学病理教研室惠赠(购自中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院基础医学细胞中心)。

1.2 药物

化瘀通络中药颗粒:丹参(批号:402300T,1.8 g/袋,等同于 10 g 饮片),川芎(批号:401235T,1.3 g/袋,等同于 6 g 饮片),地龙(批号:402044T,1.0 g/袋,等同于 10 g 饮片),水蛭(批号:408244T,1.5 g/袋,等同于 3 g 饮片),全蝎(批号:406498T,1.0 g/袋,等同于 3 g 饮片),化瘀通络中药颗粒由广东一方制药有限公司惠赠。

1.3 仪器与试剂

DL-CJ-1N 高性能无菌实验台(哈尔滨东联有限公司),BX51T-PHD-J11 倒置相差显微镜(日本奥林巴斯),HF100 三气培养箱(上海力康医疗设备有限公司),BioTek 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

DMEM-F12(1×)(美国 Gibco 公司),低糖 DMEM(1×)(美国 Gibco 公司),高糖 DMEM(1×)(美国 Gibco 公司),双抗(澳大利亚 PAA 公司),γ-干扰素(美国 Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)(美国 Acros Organics 公司),兔抗大鼠 podocin 多克隆抗体(购自美国 abcam 公司,ab93650),兔抗大鼠 CD2AP 多克隆抗体(购自北京博奥森生物技术有限公司,bs-0512R)。

2 实验方法

2.1 血清的制备

将 10 只 SD 大鼠随机分为 2 组,即正常大鼠血清组和中药血清组,每组 5 只。适应性喂养 3 d 后,根据动物与人体表面积换算用药量^[3],开始灌胃,每次 2 mL,每天 2 次,连续灌服 3 d,最后 1 天 2 次给药间隔 2 h,并于末次给药 1 h 后,无菌条件下腹主动脉取血,3000 rpm,离心 15 min,分离血清至 EP 管中,56 ℃水浴箱中 30 min 灭火,经无菌细胞过滤器(0.22 um)除菌,-20 ℃冰箱保存备用。正常大鼠血清制备:大鼠每日灌服同体积的生理盐水,与药物血清大鼠同时采血,血清分离方法同前。

2.2 细胞培养及分组

将足细胞解冻,吸出细胞悬液用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素、100 U/mL γ-INF 的完全培养基重悬足细胞,接种于 50 mL 塑料培养瓶中,置于含 5% CO₂、33 ℃ 恒温培养箱中培养。待细胞生长至 80% 融合时,采用胰蛋白酶-EDTA 消化,按 1:10 比例传代,加入非许可条件培养基,在 37 ℃ 恒温培养箱中至细胞分化成熟。本实验参考课题组的前期研究结果^[4],采用 5% 中药含药血清对足细胞干预,分别分为正常糖组(CG 组)、高糖组(HG 组)和最佳浓度的高糖加药组(HG+Z)组,取 6 孔板,调整细胞密度 2×10⁵ 个/mL,每组设 2 个复孔;取 24 孔板,调整细胞密度 8×10³/mL,每组设 6 个复孔。各组分别给予含最佳药物浓度的高糖 DMEM 培养液进行干预,分别于 24、48、72 h 后收集 6 孔板细胞,行足细胞 podocin、CD2AP 蛋白和基因的表达;24 孔板中足细胞爬片,待做免疫细胞化学检测。

2.3 标本采集及检测

2.3.1 免疫细胞化学(ICC)检测 podocin、CD2AP 的表达

24 孔板干预 48 h 后,吸弃培养液,将孔中细胞爬片用无菌 PBS 冲洗 2 次,冰丙酮固定 30 min,晾干,4 ℃保存备用。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(SP)法检测,具体步骤如下:PBS 冲洗后 0.5% Triton X-100(以 PBS 稀释)孵育 20 min,内源性过氧化酶灭活,再次 PBS 冲洗,滴加山羊血清封闭,滴加一抗(podocin、CD2AP 抗体,稀释度均为 1:100),4 ℃孵育过夜(时间≥18 h),滴加二抗(山羊抗兔),滴加 HRP 标记链亲和素,显微镜下观察显色,自来水终止,复染,梯度酒精脱水,封片拍

照。以 0.01 M PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。

2.3.2 蛋白质印迹法(Western-Blot)检测 podocin、CD2AP 蛋白的表达

各种不同培养液干预 24、48 h 和 72 h 后,吸弃培养液,用预冷的 PBS 冲洗 2 次,每孔中加入 100 μ L 预冷裂解液,用细胞刮反复刮取培养瓶底部足细胞,并吸入预冷的 500 μ L EP 管,冰浴静置裂解 1 h,12000 rpm 离心 30 min,吸取上清,即为细胞总蛋白,采用 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度,经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后冰上转膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 1 h,加入一抗(兔抗大鼠 podocin 抗体,稀释浓度 1:1000;CD2AP,稀释度 1:300),4 °C 过夜,用 TBST 洗涤,将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中,再次 TBST 洗涤,TMB 显色,洗片,目的蛋白的相对含量以目的蛋白条带的灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值表示。

2.3.3 实时荧光定量(Real-time PCR)检测 podocin、CD2AP mRNA 的表达

各种不同培养液干预 24、48 h 和 72 h 后收集细胞,用 Trizol 提取 RNA,并检测其浓度及纯度,依据 M-MLV 反转录试剂盒操作步骤,将 RNA 反转录成 cDNA。引物序列: β -actin 上游:5'-GGCTGTATTC-CCCTCCATCG -3',下游:5'- CCAGTTGGTA ACAAT-GCCATGT-3',产物长度 154bp; podocin 上游 5'-

TGAGGATGGCGGCTGAGAT-3', 下游: 5'-GGTTTG-GAGG AACTTGGGT-3', 产物长度 193bp; CD2AP 上游 5'-GGAATTCAAGCCACATCCACAA-3', 下游 5'-AC-GATCAATTCCAGTTCGTCC TC-3', 产物长度 113bp; 采用 $\Delta\Delta C_q$ 法分析基因的相对表达量。Real-Time PCR 反应条件: UDG Incubation 50 °C 2 min, Polymerase Activation 95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环;融解曲线条件: 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 95 °C 15 s。采用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析 mRNA 的相对表达量。

2.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件统计分析,各组统计数据先进行正态性和方差齐性检验,数据符合条件则选择单因素方差分析 LSD 法,数据不符合条件采用非参数检验方法,所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 实验结果

3.1 各组小鼠足细胞 podocin、CD2AP 免疫组化检测结果

显微镜下观察发现,正常组 podocin、CD2AP 两种蛋白特异性染色于足细胞细胞膜、细胞质及细胞核周围,呈细颗粒状或线状的强阳性表达;高糖在足细胞浆及细胞核周边呈弱阳性表达;最佳浓度的高糖加药组的表达较高糖组略增强,见图 1、2。

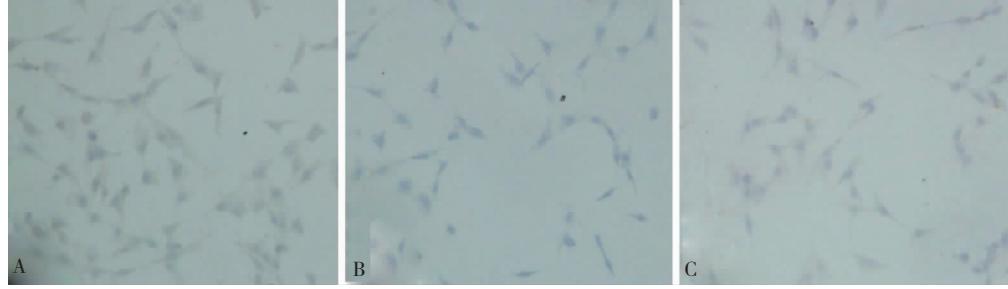


图 1 CG 组(A)、HG 组(B)及 HG + Z 组(C)小鼠足细胞 podocin 蛋白的免疫组化

Fig. 1 Immunocytochemistry for podocin in mouse podocytes of CG group (A), HG group (B) and HG + Z group (C) at 48 h ($\times 400$)



图 2 CG 组(A)、HG 组(B)及 HG + Z 组(C)小鼠足细胞 CD2AP 蛋白的免疫组化

Fig. 2 Immunocytochemistry for CD2AP in mouse podocytes of CG group (A), HG group (B) and HG + Z group at 48 h ($\times 400$)

3.2 各组小鼠足细胞 podocin、CD2AP 蛋白定量检测结果

干预足细胞 48 h 后, podocin、CD2AP 蛋白表达量与 CG 组比较, HG 组、(HG+Z) 组两组明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 HG 组比较, (HG+Z) 组表达量明显升高 ($P < 0.05$); 而不同干预 24、72 h 后, 各组 podocin、CD2AP 蛋白表达量均无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 3、表 1。

表 1 各组小鼠足细胞不同时间点 podocin、CD2AP 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression of podocin and CD2AP proteins in podocytes in each group by Western-blot ($\bar{x} \pm s$)

Time	Group	podocin/ β -actin	CD2AP/ β -actin
24 h	CG group	0.298 \pm 0.013	0.578 \pm 0.076
	HG group	0.303 \pm 0.011	0.541 \pm 0.036
	(HG+Z) group	0.281 \pm 0.021	0.582 \pm 0.111
48 h	CG group	0.706 \pm 0.037	0.618 \pm 0.067
	HG group	0.509 \pm 0.017 ^{△△}	0.357 \pm 0.035 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.611 \pm 0.044 ^{△*}	0.511 \pm 0.051 ^{△*}
72 h	CG group	0.548 \pm 0.067	0.461 \pm 0.056
	HG group	0.473 \pm 0.053	0.428 \pm 0.039
	(HG+Z) group	0.547 \pm 0.034	0.498 \pm 0.015

注:与正常糖组同时间点比较, $^{\triangle}P < 0.05$, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$; 与高糖组同时间点比较, $^{*}P < 0.05$ 。

Note: $^{\triangle}P < 0.05$, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ vs CG group, at same time point; $^{*}P < 0.05$ vs HG group at same time point.

3.3 各组小鼠足细胞 podocin、CD2AP mRNA 检测结果

与同时间点 CG 组比较, HG 组、HG+Z 组 podocin、CD2AP mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$); 与

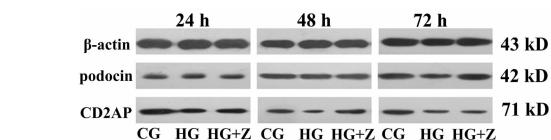


图 3 各组小鼠足细胞不同时间点 podocin、CD2AP 蛋白的表达

Fig. 3 The expression of podocin and CD2AP in mouse podocytes of different groups at different time points

表 2 各组小鼠足细胞不同时间点 podocin、CD2AP mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of podocin and CD2AP mRNA in podocytes in each group by Real-time PCR ($\bar{x} \pm s$)

Time	Group	Podocin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	CD2AP mRNA ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)
24 h	CG group	1	1
	HG group	0.46 \pm 0.07 ^{△△}	0.69 \pm 0.06 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.49 \pm 0.04 ^{△△}	0.69 \pm 0.07 ^{△△}
48 h	CG group	1	1
	HG group	0.52 \pm 0.08 ^{△△}	0.52 \pm 0.05 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.72 \pm 0.03 ^{△△**}	0.68 \pm 0.04 ^{△△**}
72 h	CG group	1	1
	HG group	0.53 \pm 0.08 ^{△△}	0.51 \pm 0.06 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.57 \pm 0.09 ^{△△}	0.56 \pm 0.11 ^{△△}

注:与正常糖组同时间点比较, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$; 与高糖组同时间点比较, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ vs CG group, at same time point; $^{**}P < 0.01$ vs HG group at same time point.

同时间点 HG 组比较, (HG+Z) 组仅 48 h podocin、CD2AP mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 24 h、72 h 与同时间点 HG 组无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 各组小鼠足细胞不同时间点 podocin、CD2AP mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of podocin and CD2AP mRNA in podocytes in each group by Real-time PCR ($\bar{x} \pm s$)

Time	Group	Podocin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	CD2AP mRNA ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)
24 h	CG group	1	1
	HG group	0.46 \pm 0.07 ^{△△}	0.69 \pm 0.06 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.49 \pm 0.04 ^{△△}	0.69 \pm 0.07 ^{△△}
48 h	CG group	1	1
	HG group	0.52 \pm 0.08 ^{△△}	0.52 \pm 0.05 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.72 \pm 0.03 ^{△△**}	0.68 \pm 0.04 ^{△△**}
72 h	CG group	1	1
	HG group	0.53 \pm 0.08 ^{△△}	0.51 \pm 0.06 ^{△△}
	(HG+Z) group	0.57 \pm 0.09 ^{△△}	0.56 \pm 0.11 ^{△△}

注:与正常糖组同时间点比较, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$; 与高糖组同时间点比较, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ vs CG group, at same time point; $^{**}P < 0.01$ vs HG group at same time point.

4 讨论与结论

足细胞位于肾小球基底膜的外侧, 为终末分化

的上皮细胞, 其表面相互交错的足突形成裂隙, 由 nephrin、podocin、CD2AP 等相关蛋白组成蛋白复合体, 有序组合构成拉链样结构, 阻止蛋白质等大分子

物质通过,形成选择性滤过屏障。足细胞裂孔膜相关蛋白的分布和表达异常是 DN 蛋白尿发生的重要机制^[5-9]。足细胞特异性蛋白 podocin, 分布于足细胞裂孔隔膜出入足突处, 在 nephrin 和 CD2AP 之间起桥梁作用, 同时还可以增强 nephrin 介导的信号转导, 对维持裂孔膜结构和功能的完整性具有重要作用^[10]。CD2AP 足细胞裂孔隔膜的另一重要成分, CD2AP 可以把 nephrin 锚在足细胞骨架上, 对于足细胞黏附、迁移和形态维持起着重要作用^[11,12], CD2AP 还可以参与激活 PI3K/AKT 信号传导通路, 增强 PI3K 和 AKT 的活性, 发挥足细胞抗凋亡作用^[13,14]。糖尿病肾病“瘀血阻络”病机理论为化瘀通络中药治疗 DN 开辟了新思路、新方向。导师陈志强教授根据中医病因病机理论结合多年临床用药经验, 发现在治疗 DN 的诸多中药复方中, 无论何种中医证型, 其中化瘀通络药丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎的使用频率非常高, 并且疗效可靠^[15]。本实验通过采用高糖刺激小鼠足细胞观察化瘀通络药对 podocin、CD2AP 的表达情况, 结果显示, 化瘀通络中药可以明显上调足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 的表达, 其可能为化瘀通络中药降低糖尿病肾病大鼠尿蛋白, 保护肾功能的作用靶点之一。

参考文献

- Guo Q(郭倩), Zhang X(张肖), Liu LF(刘利飞), et al. Impact of removing blood stasis and dredging collaterals herbs on glomerular charge barrier of rats with diabetic nephropathy. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2016, 57: 690-695.
- Chen CY(陈春宇), Chen ZQ(陈志强), Fang J(方敬), et al. Effect of Huayu Tongluo traditional Chinese medicine on kidney fibronectin and laminin expression of diabetic nephropathy rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 2134 -2137.
- Chen Q(陈奇). Traditional Chinese Medicine Pharmacology Research Methodology (中医药理研究方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2011. 1261-1263.
- Pan YM(潘永梅). The research of the effect of isoflavones phytoestrogen on biological activity of osteoblast in rats. Shi jiazhuang: Hebei Medical University (河北医科大学), PhD. 2006.
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 2003, 83: 253-307.
- Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, et al. Nephrin promotes cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol*, 2003, 163: 2337-2346.
- Reddy GR, Kotlyarevska K, Ransom RF, et al. The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(1): 32-36.
- Gao P, Meng XF, Su H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 2448-2460.
- Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW, et al. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy associated with podocyte loss. *Kidney Int*, 2007, 71: 637-645.
- Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin-a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med*, 2007, 13: 396-403.
- Shih NY, Li J, Cotran R, et al. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol*, 2001, 159: 2303-2308.
- Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283: F734-F743.
- Huber TB, Hardeben B, Kim J, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT dependent signaling. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 4917-4928.
- Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, et al. A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor beta induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279: 37004-37012.
- Wang FL(王凤丽), Chen ZQ(陈志强), Wang YH(王月华), et al. Clinical observation of treating early diabetic nephropathy by Qi Supplementing, Yin Nourishing, Blood Stasis Dispersing Collateral Dredging Recipe. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2012, 32(1): 35-38.