

# 组织蛋白酶 L 激活 PKC 信号加重 TCE 致敏小鼠肾脏损害

王焱灿<sup>1</sup>, 洪依婷<sup>1</sup>, 黄 猛<sup>1</sup>, 张家祥<sup>1</sup>, 王 峰<sup>2</sup>, 彭家乐<sup>1</sup>, 朱启星<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨组织蛋白酶 L (CTSL) 介导三氯乙烯 (TCE) 致敏小鼠肾脏损伤的分子机制。方法 41 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为空白组 (5 只) 和溶剂组 (5 只), TCE 处理组 (15 只) 和 TCE + CTSLi 处理组 (16 只), 建立 TCE 经皮致敏小鼠模型, 对 TCE + CTSLi 处理组小鼠腹腔注射 CTSL 抑制剂 (10 mg/kg) 进行预处理。根据小鼠皮肤致敏评分评估为阳性组和阴性组。通过电镜和 HE 染色观察小鼠肾脏病理情况, 血清尿素氮 (BUN) 评估小鼠肾功能水平, 免疫荧光检测 CTSL 的表达情况, TUNEL 染色评估小鼠肾脏细胞凋亡情况, 免疫印迹法检测肾脏蛋白激酶 C (PKC) 信号分子的活化情况。结果 TCE 处理组和 TCE + CTSLi 处理组的致敏率分别为 53.3% (8/15) 和 50.0% (8/16), 致敏率差异无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。病理学结果表明 TCE 致敏阳性小鼠出现肾小管细胞水肿、空泡变性, 肾小球基底膜增厚, 足细胞足突融合, 线粒体空泡样变性等表现。肾功能结果表明 TCE 致敏阳性小鼠血清 BUN 水平较其他组升高。免疫荧光结果表明 CTSL 在 TCE 致敏阳性小鼠肾脏表达水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $F = 82.438$ ), 肾脏结构细胞凋亡水平同样高于其他各组 ( $P < 0.05$ )。免疫印迹结果表明 TCE 致敏阳性小鼠肾脏中 PKC 蛋白磷酸化水平升高, 而使用 CTSLi 预处理后, TCE + CTSLi 致敏阳性组中的表达出现下调 ( $P < 0.05$ ,  $F = 35.686$ ), 肾脏细胞凋亡水平降低, 肾脏损害得以改善。结论

CTSL 可能通过激活 PKC 信号介导肾脏细胞凋亡, 加重 TCE 致敏小鼠肾脏损害。

**关键词** 三氯乙烯; 职业性三氯乙烯药疹样皮炎; 组织蛋白酶 L; 蛋白激酶 C; 肾脏损伤

中图分类号 R 135.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1116-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.019

职业暴露于三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 的部分工人可出现类似于重症药疹样的皮肤黏膜损害, 伴肝脏和肾脏等多脏器功能紊乱, 在我国被定义为三氯乙烯药疹样皮炎 (occupational medicamentosa-like dermatitis due to trichloroethylene, OMDT) [1-2]。尽管 OMDT 的发病率低, 但其病死率可高达 8.6% [3]。长期的糖皮质激素治疗导致患者出现多种并发症, 严重影响患者预后 [4]。肾脏损害是加重患者病情、影响预后的主要因素 [5], 然而目前关于 OMDT 肾脏损伤的内在机制尚不明确。

前期研究 [6-7] 表明, TCE 致敏阳性小鼠同时存在肾小球和肾小管的结构和功能损害。近年来, 大量研究 [8-9] 表明组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTSL) 广泛参与多种肾脏疾病的发病过程, 有望成为肾脏疾病治疗的新靶点。CTSL 是半胱氨酸蛋白酶家族成员, 在一定刺激下从溶酶体释放出, 介导细胞死亡和蛋白质降解等生物学过程。研究 [6] 表明 TCE 致敏小鼠受损的足细胞中存在 CTSL 的过表达, 药理学抑制 CTSL 的过表达可有效改善肾脏损害情况, 但是其具体作用机制尚不明确。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是组织蛋白酶的重要底物之一, 可介导炎症和凋亡等生物过程 [10]。该研究旨在探讨 CTSL 介导 TCE 致敏小鼠肾脏损伤的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 三氯乙烯 (分析纯, 货号: 251402)、弗氏完全佐剂 (FCA, 货号: F5881) 在美国 Sigma 公司购买; 苏木精染液 (货号: ZLI-9610)、伊红 (货号: ZLI-9613) 在北京中杉金桥生物公司购买; RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、苯甲基磺酰氟 (PMSF, 货号: ST505)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (货号: P0012) 和 5X 蛋白上样缓冲液 (货号: P0015L) 在上海碧云天生物技术有限公司购买; 4% 多聚甲醛 (货号: BL539A) 和二抗 (货号: BL003A, BL001A) 在美国 Biosharp 公司购买; ECL 发光液 (货号: K-12045-D50) 在美国 Advansta 公司购买; TUNEL 染色试剂盒 (货号: 11772465001) 在美国 Roche 公司购买; 尿素氮 (BUN, 货号: C013-2-1) 测

2022-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81874259)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学系, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学第二附属医院皮肤科性病科, 合肥 230601

<sup>3</sup> 安徽医科大学第一附属医院皮肤病研究所, 合肥 230022

作者简介: 王焱灿, 男, 硕士研究生;

朱启星, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zqxing@yeah.net

定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;在 CTSL (货号: sc-390385)、PKC (货号: sc-17804)、p-PKC (货号: sc-377565) 的鼠单克隆抗体和 CTSL 抑制剂 (货号: sc-364671) 在美国 Santa 公司购买;  $\beta$ -actin 单克隆抗体(货号: 8457s) 在美国 CST 公司购买, 驴抗鼠 IgG 荧光二抗(货号: ab150108) 在美国 abcam 公司购买。

**1.2 实验动物分组与模型建立** 在安徽医科大学实验动物中心购买 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 41 只, 6~8 周龄, 体质量(16~18) g。待适应性饲养 7 天后随机将小鼠分为空白对照组 5 只、溶剂对照组 5 只、TCE 处理组 15 只以及 TCE + CTSLi 处理组 16 只。空白对照组不做任何处理; 溶剂对照组小鼠使用不含 TCE 的相同比例丙酮和橄榄油的混合溶液, 其余处理与 TCE 处理组相同; TCE 小鼠致敏模型按既往建模方法进行建立<sup>[11]</sup>: 对小鼠背部剃毛, 实验第 1 天对 TCE 处理组和 TCE + CTSLi 处理组小鼠进行皮下注射 100  $\mu$ l 的 50% TCE 溶液与等量 FCA 的混合液, 在第 4、7、10 天背部涂抹 100  $\mu$ l 50% 的 TCE 溶液, 最后在第 17、19 天对小鼠皮肤涂抹 100  $\mu$ l 的 30% TCE 溶液分别进行初次和末次激发。TCE + CTSLi 处理组在初末激发 2 h 前进行腹腔注射 10 mg/kg 剂量的 CTSL 抑制剂。末次激发 24 h 后进行小鼠皮肤致敏评分, 末次激发 72 h 后, 麻醉、处死小鼠, 无菌取肾脏组织, 用于组织病理学和相关蛋白的水平检测。

**1.3 皮肤致敏反应视觉评分** 于末次激发 24 h 后, 对小鼠的皮肤表现进行评分。具体评分标准为: ① 0 分: 无反应; ② 1 分: 散在或小块红斑; ③ 2 分: 中度弥漫的红斑、轻微水肿; ④ 3 分: 严重红斑、水肿。根据评分  $\geq 1$  分即评为致敏阳性组, 反之评为致敏阴性组, 即将 TCE 处理组和 TCE + CTSLi 处理组分为 TCE 致敏阳性组、TCE + CTSLi 致敏阴性组、TCE + CTSLi 致敏阳性组和 TCE + CTSLi 致敏阴性组。

**1.4 免疫荧光** 将肾脏组织进行烤片, 脱蜡, 过碘酸阻断过氧化物酶(HRP) 孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次, 枸橼酸抗原修复 15 min, 洗涤, 0.5% Triton X-100 在 PBS 中通透切片 30 min, 洗涤。血清封闭 2 h, CTSL 一抗(稀释比 1:400) 于 4  $^{\circ}$ C 过夜, 24 h 后, 切片恢复至室温后, PBS 洗涤后二抗(稀释比 1:1000) 避光孵育 2 h, DAPI 染核 15 min, 封片并拍照。

**1.5 小鼠肾脏病理学检查** 取部分新鲜小鼠肾脏组织固定于 4% 多聚甲醛 3 d, 石蜡包埋制备肾脏组

织蜡块, 切片厚度为 0.4  $\mu$ m, 以进行常规 HE 染色, 显微镜观察组织病理学改变。

取新鲜小鼠肾皮质在 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸中固定 10 h 后, 按标准化制备程序制成标本, 透射电镜观察肾细胞超微结构。

**1.6 TUNEL 染色** TUNEL 染色按照试剂盒说明书进行, 蛋白酶 K 穿孔后, 肾脏切片用 TUNEL 反应混合物在 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后用 DAB 显色, 显微镜拍照, Image J 软件计算凋亡细胞率。

**1.6 Western blot 检测 PKC、p-PKC 蛋白表达水平** 新鲜肾脏组织在 RIPA 裂解液匀浆裂解后, 提取总蛋白, 并测定蛋白浓度。12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳结束后, 200 mA 恒流湿转 3 h; PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h, 将膜与针对 PKC(稀释比 1:1000)、p-PKC(稀释比 1:1000) 和  $\beta$ -actin(稀释比 1:10000) 的抗体于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天, PBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 二抗(稀释比 1:10000) 室温孵育 2 h 后, 重复洗膜, 化学发光仪显影, Image-Pro Plus software6.0 软件分析条带光密度值。

**1.7 统计学处理** 采用 Excel 软件进行数据整理, SPSS 23.0 软件进行统计分析, 正态分布资料的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA) 组间均数两两比较采用 LSD 法, 检验水准  $\alpha$  取 0.05(双侧)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠皮肤致敏情况与肾脏病理学改变情况** 根据皮肤致敏反应对小鼠进行评分, 具体如下: 空白组与溶剂组小鼠背部均未见明显水肿和红斑, 致敏评分均为 0。TCE 处理组致敏率为 53.3% (8/15), 其中评为 1 分的 4 只, 评为 2 分的 4 只。TCE + CTSLi 处理组致敏率为 50.0% (8/16), 其中评为 1 分的 4 只, 评为 2 分的 4 只。且两组间小鼠致敏率无统计学差异( $P > 0.05$ )。

HE 染色结果显示, 空白对照组、溶剂对照组、TCE 致敏阴性组和 TCE + CTSLi 致敏阴性组小鼠的肾小球与肾小管结构完整, 未见明显病理学损伤。与溶剂对照组相比, TCE 致敏阳性组小鼠的肾小管上皮细胞出现明显细胞水肿、空泡变性等。而 TCE + CTSLi 致敏阳性组小鼠较 TCE 致敏阳性组小鼠肾脏上述损伤减轻。经检测小鼠血清 BUN 水平发现, 与其他组相比, TCE 致敏阳性组(25.268  $\pm$  5.680) 和 TCE + CTSLi 致敏阳性组(17.365  $\pm$  2.265) 小鼠

血清中的 BUN 水平升高,而 TCE + CTSLi 致敏阳性组较 TCE 致敏阳性组 BUN 的水平有一定程度下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $F = 18.283$ );其他组 BUN 水平相对较低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

**2.2 CTSL 过表达对 TCE 致敏小鼠肾脏损害的影响** 本次研究结果发现 CTSL 在 TCE 致敏阳性组小鼠肾脏尤其在肾小球上高表达,见图 3。电镜结果显示,TCE 致敏阳性组小鼠肾小球滤过膜结构遭到破坏,基底膜增厚,且厚度不均,足细胞足突结构受损,出现融合、消失,线粒体水肿和空泡样变性,见图 4。与 TCE 致敏阳性组相比,TCE + CTSLi 致敏阳性组小鼠 CTSL 表达水平降低( $P < 0.05$ ,  $F = 82.438$ )、肾小球基底膜损伤程度减轻。

**2.3 CTSL 诱导 TCE 致敏小鼠肾脏结构细胞凋亡**

通过 TUNEL 染色评估 CTSL 诱导细胞凋亡的情况。结果显示:与空白对照组相比,溶剂对照组、TCE 致敏阴性组、TCE + CTSLi 致敏阴性组小鼠肾小球结构细胞凋亡比例未见明显异常,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 TCE 致敏阳性组相比,TCE 致敏阳性组小鼠肾小球凋亡细胞比例升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 TCE 致敏阳性组相比,TCE + CTSLi 致敏组小鼠肾小球凋亡细胞比例下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不仅如此,肾小管细胞凋亡情况与肾小球相似,TCE 致敏阳性组小鼠肾小管凋亡细胞比例高于其他各组( $P < 0.05$ ),而 TCE + CTSLi 致敏阳性组小鼠肾小管凋亡细胞比例低于 TCE 致敏阳性组,见图 5。以上结果说明,CTSL 可以通过同时诱导肾小球和肾小管细胞凋亡,加重 TCE 致敏小鼠肾结构损害。

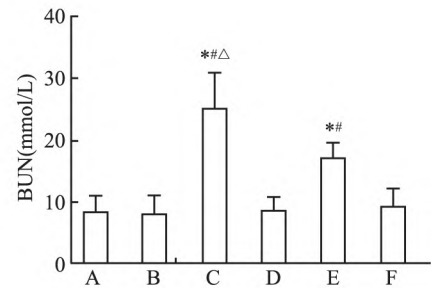
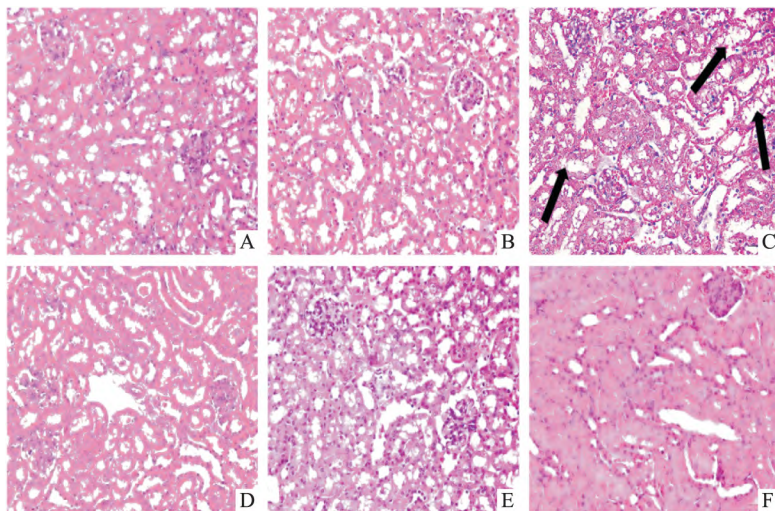


图 1 各组小鼠肾脏病理改变情况 HE 染色  $\times 400$  图 2 各组小鼠血清 BUN 水平

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 致敏阳性组; D: TCE 致敏阴性组; E: TCE + CTSLi 致敏阳性组; F: TCE + CTSLi 致敏阴性组; 与溶剂组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 TCE 致敏阴性组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 TCE + CTSLi 致敏阳性组比较:  $\Delta P < 0.05$

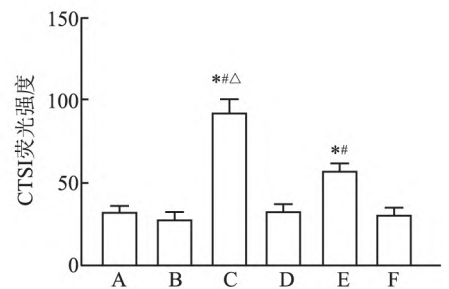
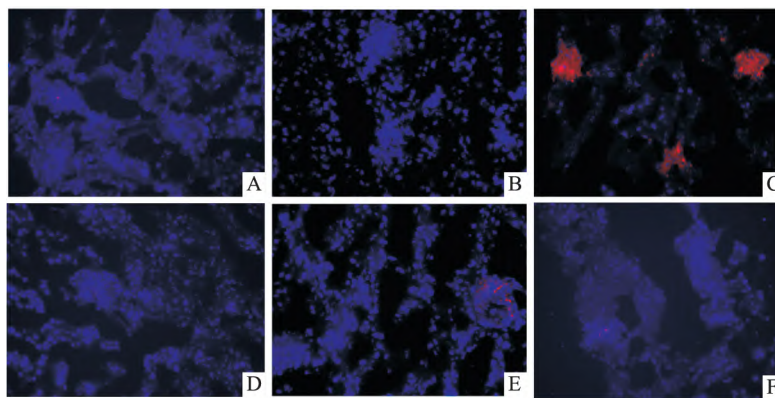


图 3 不同组别小鼠肾脏 CTSL 表达情况

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 致敏阳性组; D: TCE 致敏阴性组; E: TCE + CTSLi 致敏阳性组; F: TCE + CTSLi 致敏阴性组; 与溶剂组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 TCE 致敏阴性组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 TCE + CTSLi 致敏阳性组比较:  $\Delta P < 0.05$

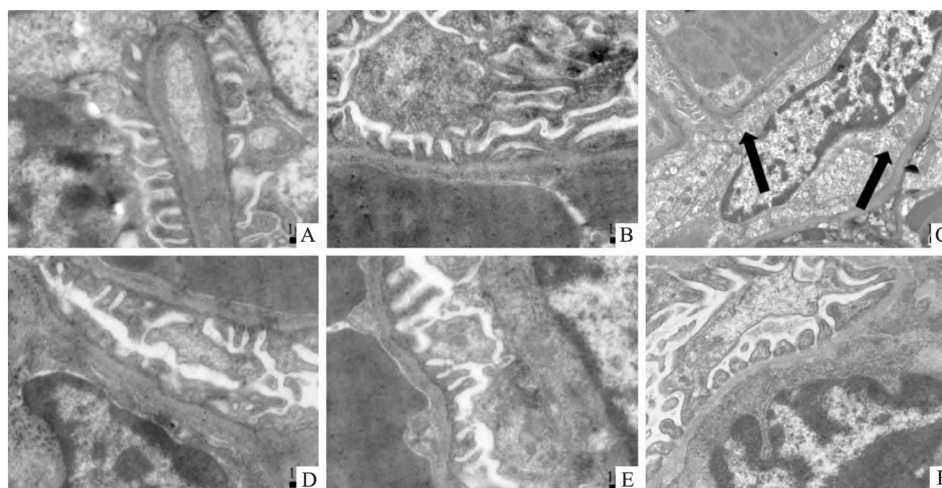


图4 不同组别小鼠肾脏形态学改变情况电镜 ×30 000

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 致敏阳性组; D: TCE 致敏阴性组; E: TCE + CTSLi 致敏阳性组; F: TCE + CTSLi 致敏阴性组

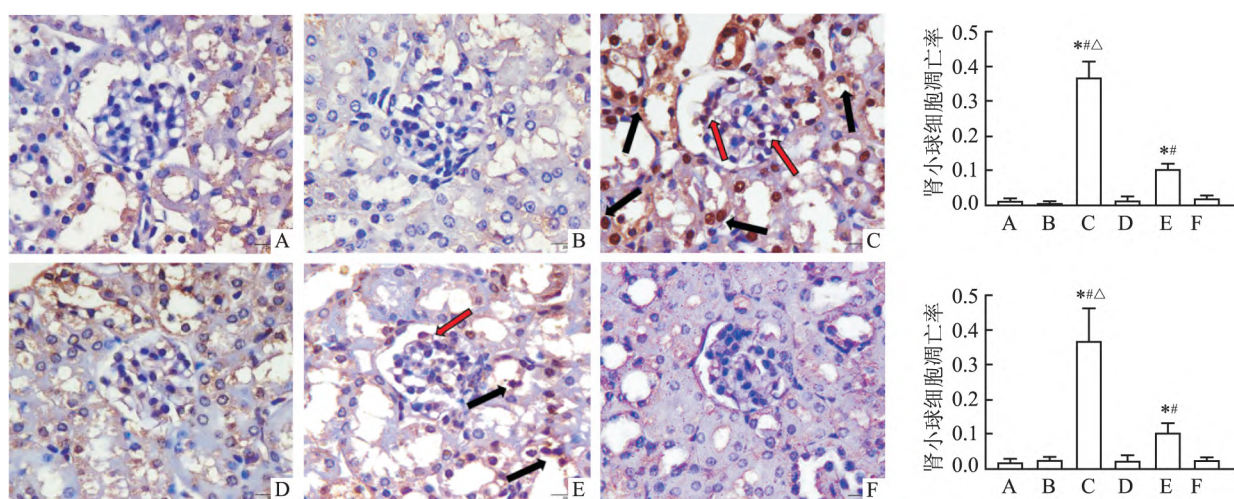


图5 不同组别小鼠肾脏结构细胞凋亡情况 TUNEL 染色 ×1 000

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 致敏阳性组; D: TCE 致敏阴性组; E: TCE + CTSLi 致敏阳性组; F: TCE + CTSLi 致敏阴性组; 与溶剂组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 TCE 致敏阴性组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 TCE + CTSLi 致敏阳性组比较: Δ  $P < 0.05$

**2.4 CTSL 激活 TCE 致敏小鼠肾脏 PKC 信号分子** Western blot 检测结果表明,空白对照组、溶剂对照组、TCE 致敏阴性组和 TCE + CTSLi 致敏阴性组中 p-PKC 蛋白的相对表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与其他各组相比, TCE 致敏阳性组和 TCE + CTSLi 致敏阳性组的 p-PKC 的蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 TCE 致敏组相比, TCE + CTSLi 致敏阳性组 p-PKC 蛋白相对表达有所下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $F = 35.686$ ), 见图 6。

### 3 讨论

作为 OMDT 常见并发症之一, TCE 诱导的肾脏损害不仅会增加患者的治疗难度, 而且严重影响患

者预后<sup>[5, 12]</sup>。近年来, 多项研究<sup>[8-9]</sup>提示 CTSL 在多种自身免疫性肾脏疾病中发挥着关键作用。本研究表明药理学抑制 TCE 致敏阳性小鼠肾脏 CTSL 的过表达后, 肾脏损伤减轻, 提示 CTSL 有望成为 OMDT 肾脏损害临床治疗的潜在作用靶点。本课题组既往研究提示 CTSL 可能是 TCE 致敏所致肾小球损伤重要参与者, 本次研究结果进一步显示, 在 TCE 致敏阳性小鼠中肾脏过表达的 CTSL 与肾小球凋亡细胞水平呈正相关, 抑制 CTSL 表达后, 肾小球凋亡水平降低, 提示过表达的 CTSL 可能是肾脏结构细胞凋亡的重要诱因之一。尽管病理学结果显示致敏阳性小鼠肾小球细胞的损害, 然而过表达的 CTSL 是否破坏肾小球屏障结构还有待探究。

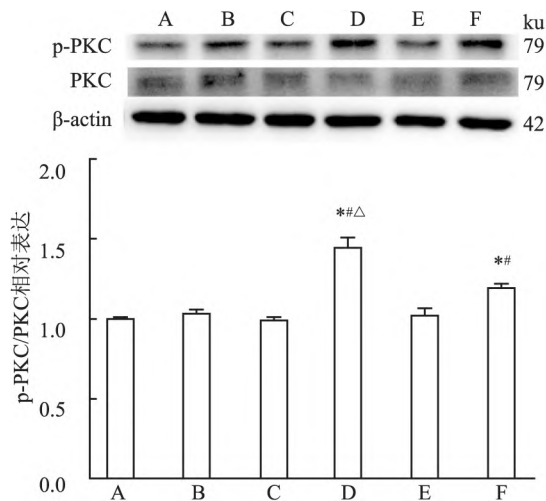


图6 不同组别小鼠肾脏 PKC、p-PKC 蛋白表达

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 致敏阳性组; D: TCE 致敏阴性组; E: TCE + CTSLi 致敏阳性组; F: TCE + CTSLi 致敏阴性组; 与溶剂组比较: \* P < 0.05; 与 TCE 致敏阴性组比较: # P < 0.05; 与 TCE + CTSLi 致敏阳性组比较: △ P < 0.05

虽然本研究发现 CTSL 主要表达于 TCE 致敏小鼠受损的肾小球,但是通过药理学抑制 CTSL 的表达后,TCE 致敏所致的肾小管损伤同样有所减轻。课题组推测,CTSL 可能是 TCE 致敏所致肾损伤中肾小球和肾小管对话的一个关键作用环节。肾小球-肾小管之间存在广泛的生物信息联系,存在许多共同的信号通路的参与,其串扰逐渐引起了广泛关注。由于球-管的特殊生理结构,肾小球分泌的包括血管内皮细胞生长因子、血管生成素-1、炎症因子在内的多种生物信息因子可通过旁分泌等途径作用于肾小管上皮细胞,导致其结构和功能发生不同程度的改变<sup>[13]</sup>。另一方面,肾小管炎症反应同样可以反过来损害肾小球的滤过功能,导致肾功能的下降。肾小球-肾小管的这种交互作用于信息传递在维系正常肾脏结构和功能中发挥重要作用,这种正常的生物信息传递的破坏也是多种肾脏疾病发病的分子机制。

慢性肾病的体外研究<sup>[14]</sup>表明细胞内白蛋白的超载可诱导内质网应激和激活 PKC/p38 MAPK 通路,介导足细胞凋亡。此外,PKC 还是导致蛋白尿形成的关键分子,尿蛋白等生物大分子的过度运输不仅可加重肾小管负载,还可加重肾小管间质炎症损伤以及诱导 RTECs 凋亡。研究<sup>[15]</sup>显示药理学抑制 PKC 过表达可通过降低蛋白尿的生成,从而减轻肾小管负载和肾小管细胞凋亡的发生。本课题组前期研究<sup>[16]</sup>表明 CTSL 可通过切割补体 C3,同时还可

激活 p38 MAPK 和 NF-κB 通路。由此可见,PKC 信号在串联肾小球-肾小管结构和功能中发挥关键作用。本研究中,蛋白免疫印迹结果显示 TCE 致敏阳性小鼠肾脏中 PKC 磷酸化水平明显升高,而 CTSLi 的预处理降低其表达。因此,推测在 TCE 致敏肾损伤过程中,PKC 可能是 CTSL 介导 TCE 所致肾小球和肾小管的损伤过程中的一个关键作用分子。

综上所述,在 TCE 致敏过程中,过表达的 CTSL 可以通过激活 PKC 信号通路,诱导肾小球细胞和肾小管细胞凋亡,介导肾脏损伤。药理学抑制 CTSL 的过表达可以明显改善 TCE 致敏所致小鼠肾脏损伤,有望成为治疗 OMDT 肾脏损伤的潜在靶点之一。

### 参考文献

- [1] Iritas S B, Dip A, Gunduzoz M, et al. Assessment of potential cardiovascular risk in trichloroethylene exposure by serum methylated arginine levels[J]. Int J Environ Heal R, 2021, 31( 1): 63 - 74.
- [2] Zhang J, Li N, Yang L, et al. Bradykinin contributes to immune liver injury via B2R receptor-mediated pathways in trichloroethylene sensitized mice: A role in Kupffer cell activation[J]. Toxicology, 2019, 415: 37 - 48.
- [3] 金佳纯, 黄健, 柳柳, 等. 广东省职业性三氯乙烯药疹样皮炎病例分布特征分析[J]. 中国职业医学, 2019, 46( 3): 302 - 6.
- [4] 黄永顺, 金佳纯, 柳柳, 等. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎病例随访报告[J]. 中国职业医学, 2019, 46( 3): 354 - 8.
- [5] 张丽华, 余惜金, 李敏, 等. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎肝脾肾 B 超的动态观察[J]. 中国工业医学杂志, 2011, 24( 3): 185 - 7.
- [6] Yang X, Jiang W, Huang M, et al. Intracellular complement activation in podocytes aggravates immune kidney injury in trichloroethylene-sensitized mice[J]. J Toxicol Sci, 2020, 45( 11): 681 - 93.
- [7] Wang F, Huang L P, Dai Y Y, et al. Terminal complement complex C5b - 9 reduced megalin and cubilin-mediated tubule proteins uptake in a mouse model of trichloroethylene hypersensitivity syndrome[J]. Toxicol Lett, 2019, 317: 110 - 9.
- [8] Tang T T, Lv L L, Pan M M, et al. Hydroxychloroquine attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting cathepsin mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. Cell death dis, 2018, 9( 3): 351.
- [9] Khalil R, Koop K, Kreutz R, et al. Increased dynamin expression precedes proteinuria in glomerular disease [J]. J Pathol, 2019, 247( 2): 177 - 85.
- [10] Liu Q, Zhang Y, Liu S, et al. Cathepsin C promotes microglia M1 polarization and aggravates neuroinflammation via activation of Ca2 + - dependent PKC/p38MAPK/NF-κB pathway [J]. J Neuroin-

- flamm, 2019, 16(1): 10.
- [11] Wang H, Zhang J X, Li S L, et al. An Animal Model of Trichloroethylene-Induced Skin Sensitization in BALB/c Mice. *Int J Toxicol*, 2015, 34(5): 442–53.
- [12] 陆敏霞, 汪国海, 徐琪, 等. 重症三氯乙烯药疹样皮炎伴肝肾和消化道损害一例[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2019, 3(3): 231–3.
- [13] Chen S J, Lv L L, Liu B C, et al. Crosstalk between tubular epithelial cells and glomerular endothelial cells in diabetic kidney disease[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12763.
- [14] Gonçalves G L, Costa-Pessoa J M, Thieme K, et al. Intracellular albumin overload elicits endoplasmic reticulum stress and PKC-delta-p38 MAPK pathway activation to induce podocyte apoptosis[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 18012.
- [15] Xu D, Chen P P, Wang B, et al. NIX-mediated mitophagy protects against proteinuria-induced tubular cell apoptosis and renal injury[J]. *AM J Physiol-Renal*, 2019, 316(2): F382–95.
- [16] Wang G, Zhang J, Dai Y, et al. Local renal complement activation mediates immune kidney injury by inducing endothelin-1 signaling and inflammation in trichloroethylene-sensitized mice[J]. *Toxicol Lett*, 2020, 333: 130–39.

## Cathepsin L aggravated kidney injury by activating PKC signal in TCE-sensitized mice

Wang Yican<sup>1</sup>, Hong Yiting<sup>1</sup>, Huang Meng<sup>1</sup>, Zhang Jiayang<sup>1</sup>, Wang Feng<sup>2</sup>, Peng Jiale<sup>1</sup>, Zhu Qixing<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Occupational Hygiene and Environmental Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>3</sup>Institute of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of cathepsin L(CTSL)-mediated kidney injury in trichloroethylene(TCE)-sensitized mice. **Methods** 41 BALB/C mice were randomly divided into blank group ( $n = 5$ ), solvent group ( $n = 5$ ), TCE treatment group ( $n = 15$ ) and TCE + CTSLi treatment group ( $n = 16$ ). TCE percutaneous sensitization mouse model was established, and the mice were evaluated as positive group and negative group according to skin sensitization score. The renal pathology of mice was observed by electron microscopy and HE staining, the renal function level of mice was assessed by serum urea nitrogen (BUN). The expression of CTSL was detected by immunofluorescence, the apoptosis of renal cells was assessed by TUNEL staining, and the activation of renal protein kinase C (PKC) signal molecule was detected by Western blot. **Results** The sensitization rates of TCE treatment group and TCE + CTSLi treatment group were 53.3% (8/15) and 50.0% (8/16), respectively, and there was no statistical difference in sensitization rates ( $P > 0.05$ ). Pathological results showed that TCE sensitized-mice showed edema and vacuolar degeneration of renal tubular cells, thickening of glomerular basement membrane, fusion of podocytes and mitochondria vacuolar degeneration. The results of renal function showed that the serum BUN level of TCE sensitized mice was higher than that of other groups. Immunofluorescence results showed that the expression level of CTSL in the kidney of TCE-sensitized positive mice increased ( $P < 0.05$ ,  $F = 82.438$ ), and the apoptosis level of renal structure cells was also higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that the phosphorylation of PKC protein in the kidney of TCE-sensitized mice increased, while the expression of PKC protein in TCE + CTSLi sensitized mice was down-regulated after CTSLi pretreatment ( $P < 0.05$ ,  $F = 35.686$ ), the level of renal cell apoptosis decreased, and renal damage was improved. **Conclusion** CTSL might aggravate renal damage via activation of PKC signaling in TCE-sensitized mouse.

**Key words** trichloroethylene; occupational medicamentosa-like dermatitis due to trichloroethylene; cathepsin L; protein kinase C; kidney damage