

· 论 著 ·

LC3 在早期糖尿病大鼠肾脏中的表达及意义*

颜晓勇¹, 张茂平^{2△}, 吴蔚桦²

(1. 遵义医学院附属医院肾内科, 贵州遵义 563003; 2. 泸州医学院附属第二医院肾内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)在早期糖尿病大鼠肾脏中表达的意义及其与糖尿病肾病(DN)发生发展的关系。方法 实验分为模型组和正常对照组。采用链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠 DN 模型, 分别于造模成功后 2、4、6、8 周, 用免疫组化、原位末端标记法(TUNEL)染色分析和计算机图像分析技术连续多时点观察肾脏 LC3 的表达变化和细胞凋亡情况, 并分析二者之间的关系及其与肾脏病理变化指标的相关性。结果 模型组 2、4、6、8 周肾脏 LC3 蛋白表达均弱于对照组($P < 0.05$); 模型组各时点间 LC3 表达水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。模型组 LC3 的表达量与尿蛋白、肾脏肥大指数(KI)呈负相关($P < 0.01$)。模型组 2、4、6、8 周肾小管细胞凋亡细胞均高于对照组($P < 0.05$); 模型组各时间点肾小管细胞凋亡指数比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。模型组肾脏细胞凋亡指数与尿蛋白、KI 呈正相关($P < 0.01$)。LC3 表达量与细胞凋亡指数呈负相关($P < 0.01$)。结论 自噬的缺乏可能促进了 DN 的发展, 细胞凋亡参与了早期 DN 的发生发展, 两者相互作用, 可能加重糖尿病的肾脏损伤。

关键词:糖尿病肾病; 细胞自噬; 微管相关蛋白 1 轻链 3; 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)21-2128-03

The expression and significance of LC3 in the kidney of early-stage diabetic rats*

Yan Xiaoyong¹, Zhang Maoping^{2△}, Wu Weihua²

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China;

2. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the significance of LC3 expression in the renal tissue of early-stage diabetic rats and relationship between LC3 expression and development of diabetic nephropathy. **Methods** The Sprague-Dawley(SD) rats were divided into the diabetic and control groups. The diabetic group was treated by streptozotocin(STZ). The expression of LC3 in renal tissue was detected by immunohistochemistry and the apoptosis of renal cell was measured by TUNEL assay at 2, 4, 6 and 8 weeks. The level of LC3 expression and the apoptotic index(AI) of renal cell were quantified by computer image analysis. The relationship between LC3 expression and the renal AI, kidney/body weight(KI), urinary protein excretion was analyzed. **Results** As compared with the control group, LC3 expression in kidney tubules of the diabetic group was significantly decreased at the same time points of 2, 4, 6 and 8 weeks($P < 0.05$). The level of LC3 expression was negatively correlated with kidney/body weight and urine protein excretion($P < 0.01$). The renal tubular cells AI was higher than that of control group($P < 0.05$) and positively correlated with kidney/body weight and urine protein excretion($P < 0.01$), respectively. It was found that there was a strong negative correlation between the level of LC3 expression and the renal cell AI($P < 0.01$). **Conclusion** The downregulated expression of LC3 and the increased apoptosis of renal cells in early stage DN rats may contribute to the development of DN. Their interaction may promote the renal injury of diabetes mellitus.

Key words: diabetic nephropathy; autophagy; microtubule-associated protein 1 light chain 3; apoptosis

糖尿病肾病(diabetes nephropathy, DN)为糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一, 是导致终末期肾功能衰竭和糖尿病致死的主要原因。自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 是真核细胞特有的生命现象, 自噬性细胞死亡有别于凋亡(I 型程序性死亡), 而被称为 II 型程序性死亡。近年来的研究提示, 细胞自噬在肾脏疾病中扮演重要的角色, 特别是足细胞病^[1-2], 如微小病变肾病、局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、膜性肾病、DN 等, 推测细胞自噬与 DN 的发生、发展有关, 然而这方面的研究还鲜见报道。本研究检测了 DN 大鼠模型各时间点细胞自噬标志蛋白——微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein

1 light chain 3, LC3)的表达水平和细胞凋亡水平, 探讨其关系和意义, 为进一步研究 DN 发病机制和干预治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备 成年雄性 SD 大鼠 48 只, 8 周龄, 体质量(230±20)g, 购至四川大学实验动物中心。标准化饲养房笼中饲养。设模型组和正常对照组, 每组设 2、4、6 和 8 周, 共 4 个观察时间点, 各组每个时间点 6 只大鼠。模型组采用 1%链脲菌素(STZ, Sigma 公司) 55 mg/kg 一次性腹腔内注射诱导造模。72 h 后至少连续 3 d 尾静脉采血测血糖, 以连续 3 次血糖大于 16.7 mmol/L, 尿量大于原尿量的 150%, 尿蛋白排泄大于 30 mg/24 h 者为成模标准^[3]。正常对照组用同剂量

* 基金项目: 四川省卫生计生厅课题(090917); 泸州医学院课题[泸医院科发(2009)5号]。△ 通讯作者, Tel: 13568150066; E-mail: 12390369@qq.com。

表 1 两组大鼠血糖、KI、尿蛋白及 Ccr 比较(n=6)

观察时间	血糖(mmol/L)		KI(mg/g×10 ³)		尿蛋白(mg/24 h)		Ccr(mL/min)	
	正常对照组	模型组	正常对照组	模型组	正常对照组	模型组	正常对照组	模型组
2 周	5.82±0.39	19.86±1.67**	3.60±0.20	5.24±0.21**	10.20±1.55	32.54±2.64*	1.48±0.02	1.47±0.04
4 周	5.90±0.22	24.72±2.02**	3.38±0.08	5.39±0.25**	10.68±1.30	42.98±3.88*	1.47±0.03	2.02±0.07*△
6 周	6.08±0.50	27.16±2.29**	3.50±0.12	6.11±0.28**	11.40±1.45	63.74±4.61**△	1.49±0.03	2.22±0.09*△
8 周	6.12±0.69	32.30±2.75**	3.46±0.18	6.80±0.23**	11.52±1.40	75.26±4.90**△△	1.50±0.02	2.74±0.16**△△

*: P<0.05, **: P<0.01, 与正常对照组比较; △: P<0.05, △△: P<0.01, 与同组第 2 周比较。

的生理盐水腹腔注射。各实验组均采用相同的大鼠标准食物和饮用水,成模后均未使用降糖药。每周测定 1 次血糖、尿蛋白,并定期监测一般项目。

1.2 标本收集与生化指标检测 在实验的 2、4、6、8 周分别通过尾静脉测量大鼠血糖,并将每只大鼠放入代谢笼留取 24 h 尿液,记录 24 h 尿量,检测 24 h 尿白蛋白量(ualb)和 24 h 尿肌酐浓度(urea);同时从两组中随机选取 6 只大鼠处死,测量大鼠体质量;股静脉取血 5 mL 检测血清肌酐(Cr)。经腹主动脉灌注生理盐水后摘取肾脏,立即将右肾组织存入-80℃低温冰箱;称取左肾质量,取左肾组织 10%甲醛固定,待作病理学检查。计算内生肌酐清除率(Ccr)和肾脏肥大指数(KI),公式为:Ccr=[尿肌酐(mmol/L)×尿量(mL)×100]/[血肌酐(mmol/L)×体质量(g)×1440],KI=肾质量/体质量。

1.3 肾脏病理学检测 普通 HE 染色,观察两组各时点肾小球、肾小管间质病变。

1.4 肾脏 LC3 免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱蜡、水化,3% H₂O₂ 甲醇液浸泡,微波修复抗原,正常羊血清封闭,先后滴加稀释的一抗(兔抗大鼠 LC3 抗体,英国 Abcam 公司),羊抗兔二抗,ABC 复合物及 DAB 显色剂,苏木素复染,脱水,透明,甘油明胶封片。以 PBS 代替一抗作为对照。先低倍镜下观察着染情况,再在高倍镜下随机选皮质区 30 个肾小球,采用全自动图像分析系统(Image-proplus 6.0)分别计数其积分光密度(IOD)值,取其均值分析。

1.5 原位末端标记法(TUNEL)染色观察凋亡细胞 石蜡切片 5 μm,二甲苯脱蜡,PBS 冲洗,胃蛋白酶消化,PBS 冲洗;加 TUNEL 反应液(武汉博士德公司提供)37℃孵育 60 min,PBS 冲洗;加碱性磷酸酶抗体 37℃孵育 30 min,PBS 冲洗;加 1~2 滴 BCIP/NBT,室温下孵育 10~30 min,PBS 冲洗;苏木素复染;水性封片剂封片、烘干,光镜观察细胞核红色为阳性。在光镜下(×400),每组取 6 个样本,每个样本计数 5 个不同视野凋亡的肾小管细胞数,与同视野肾小管细胞总数的百分比率,计算其均值,以确定平均凋亡指数^[4]。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差不齐时行数据对数变换使其方差齐,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验;两组均数比较采用独立样本均数 t 检验;变量间的关系判断采用 Pearson 相关分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

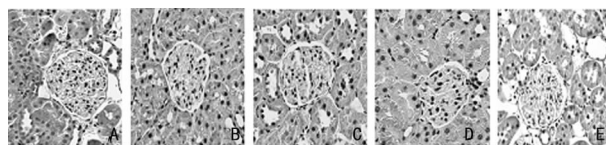
2 结 果

2.1 两组大鼠肾脏病理学比较 肾脏病理 HE 染色显示正常对照组肾小球、肾小管间质、肾脏血管未发现明显异常,而模型组 2 周即出现明显肾小球增大,系膜基质逐渐增多,系膜细胞增多,小管扩张。

2.2 两组大鼠血糖、KI、尿蛋白及 Ccr 比较 两组大鼠血糖、

KI、尿蛋白及 Ccr 比较见表 1。

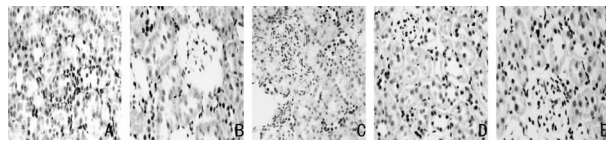
2.3 两组大鼠 LC3 免疫组化结果比较 LC3 主要表达于肾小管,模型组 2、4、6、8 周肾脏 LC3 阳性产物(棕黄色) IOD 值均弱于对照组(P<0.05);模型组各时点间 LC3 阳性产物 IOD 值比较,差异有统计学意义(P<0.01)。见图 1。



A: 对照组; B、C、D、E: 模型组 2、4、6、8 周。

图 1 LC3 在大鼠肾组织中的表达情况(免疫组化染色)

2.4 两组大鼠细胞凋亡指数比较 模型组 2、4、6、8 周肾脏凋亡细胞增多(红色为凋亡细胞),主要出现于肾小管,其凋亡指数均高于对照组(P<0.05);模型组各时点凋亡指数比较,差异均有统计学意义(P<0.01)。见图 2。



A: 对照组; B、C、D、E: 模型组 2、4、6、8 周。

图 2 大鼠肾脏细胞的凋亡情况(TUNEL 染色)

2.5 相关性分析 模型组 LC3 表达量与尿蛋白、KI 呈负相关($r = -0.604, P < 0.01; r = -0.653, P < 0.01$);模型组肾脏细胞凋亡指数与尿蛋白、KI 呈正相关($r = 0.829, P < 0.01; r = 0.801, P < 0.01$);LC3 表达量与细胞凋亡指数呈负相关($r = -0.835, P < 0.01$)。

3 讨 论

DN 的发病机制至今尚未完全阐明,近年来的研究提示,自噬在肾脏疾病中扮演重要的角色,推测细胞自噬可能与糖尿病肾病的发生、发展有关。本研究显示:LC3 主要表达于肾小管,模型组 2、4、6、8 周肾脏 LC3 阳性产物(棕黄色) IOD 值均弱于对照组(P<0.05);模型组各时点间 LC3 阳性产物 IOD 值比较,差异有统计学意义(P<0.01);模型组 LC3 的表达量与尿蛋白、KI 呈负相关(P<0.01)。提示自噬的缺乏可能促进了早期 DN 的发展。自噬在细胞和组织稳态中发挥重要作用:(1)基础性的自噬有修复细胞和维持细胞生命的作用;(2)过量的自噬会导致细胞程序性死亡^[5]。细胞自噬水平的降低使其对肾脏细胞的修复和生命维持功能减弱,引起肾小管功能障碍,对蛋白的重吸收减少和适应细胞代谢负荷增加的功能亦减弱,从而可能导致肾脏损伤。

糖尿病时,内皮细胞葡萄糖转运子表达增加而使胞内葡萄

糖含量增加^[6],进而增加了细胞内活性氧,这可能是糖尿病肾病凋亡增加的主要机制^[7]。这与本研究结果相一致,模型组 2、4、6、8 周肾脏凋亡细胞增多(红色为凋亡细胞),主要出现于肾小管,其凋亡指数均高于对照组($P < 0.05$);模型组各时点凋亡指数比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);模型组肾小管细胞凋亡指数与尿蛋白、KI 呈正相关($P < 0.01$)。表明细胞凋亡与早期糖尿病肾病的发生、发展密切相关。

本研究还发现 LC3 蛋白表达量与肾小管细胞凋亡指数呈负相关($P < 0.01$),且细胞自噬减弱和凋亡增多均主要发生在同一部位——肾小管。细胞自噬可以单独通过细胞保护作用或自身破坏吞噬作用决定细胞的生存和死亡,也能通过比较复杂的机制与细胞凋亡联系起来,从而对细胞产生影响。尽快地清除细胞凋亡残余物是防止组织损伤的关键^[8]。有研究表明自噬基因 atg5 缺失的胚胎同时具有凋亡细胞清除不足和组织损伤^[9]。不能有效的清除凋亡细胞会引起组织对自身抗原的耐受,从而导致自身免疫性疾病^[8]。细胞自噬对凋亡细胞及其产物的清除不足,可导致组织损伤和炎症,这一机制可能也参与了 DN 的发生、发展。然而,细胞自噬在 DN 中的作用及其与细胞凋亡相互作用的具体机制,调高细胞自噬和减少细胞凋亡是否有助 DN 微血管病变的改善值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Sato S, Kitamura H, Adachi A, et al. Two types of autophagy in the podocytes in renal biopsy specimens: ultrastructural study[J]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 2006, 38(2/3):167-174.
- [2] Asanuma K, Tanida I, Shirato I, et al. MAP-LC3, a prom-

ising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from Pan nephrosis[J]. *Faseb J*, 2003, 17(9):1165-1167.

- [3] 汪琛颖, 司马义·萨依木, 马晴, 等. 糖尿病肾病大鼠胰基因组 DNA 甲基化状态的变化[J]. *北京师范大学学报:自然科学版*, 2002, 38(3):395-398.
- [4] 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]. *J Biol Chem*, 2004, 279(35):37004-37012.
- [5] Vojo D, Autophagy BL. Immunity, and microbial adaptations[J]. *Cell*, 2009, 5(16):527-549.
- [6] Sheikh-Ali M, Sultan S, Abdul-Razzak A, et al. Effects of antioxidants on glucose-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in endothelial cells[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(2):161-166.
- [7] Fa WE, Dekker D, Berden JH, et al. The role of reactive Oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(12):1451-1458.
- [8] Grossmayer GE, Munoz LE, Gaipf US, et al. Removal of dying cells and systemic lupus erythematosus[J]. *Mod Rheumatol*, 2005, 15(6):383-390.
- [9] Qu XP, Zou ZJ, Sun QH, et al. Autophagy Gene-Dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development[J]. *Cell*, 2007, 128(5):931-946.

(收稿日期:2011-12-16 修回日期:2012-03-06)

(上接第 2127 页)

- [40] Khazardoost S, Hantoushzadeh S, Khooshideh M, et al. Risk factors for meconium aspiration in meconium stained amniotic fluid[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2007, 27(6):577-579.
- [41] Wiswell TE, Fuloria M. Management of meconium-stained amniotic fluid[J]. *Clin Perinatol*, 1999, 26(3):659-668.
- [42] Gadzinowski J, Kowalska K, Vidyasagar D. Treatment of MAS with PPHN using combined therapy: SLL, bolus surfactant and iNO[J]. *J Perinatol*, 2008, 28 Suppl 3:S56-66.
- [43] Downard CD, Wilson JM. Current therapy of infants with congenital diaphragmatic hernia[J]. *Semin Neonatol*, 2003, 8(3):215-221.
- [44] Doyle NM, Lally KP. The CDH Study Group and advances in the clinical care of the patient with congenital diaphragmatic hernia[J]. *Semin Perinatol*, 2004, 28(3):174-184.
- [45] Valfre L, Braguglia A, Conforti A, et al. Long term fol-

low-up in high-risk congenital diaphragmatic hernia survivors: patching the diaphragm affects the outcome[J]. *J Pediatr Surg*, 2011, 46(1):52-56.

- [46] Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, et al. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis[J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(6):406-410.
- [47] Nogee LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66:601-623.
- [48] Palomar LM, Nogee LM, Sweet SC, et al. Long-term outcomes after infant lung transplantation for surfactant protein B deficiency related to other causes of respiratory failure[J]. *J Pediatr*, 2006, 149(4):548-553.
- [49] Bonella F, Bauer PC, Griese M, et al. Pulmonary alveolar proteinosis: new insights from a single-center cohort of 70 patients[J]. *Respir Med*, 2011, 105(12):1908-1916.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-03-06)