

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01316

不同碘缺乏大鼠肾组织 UCP2 及 caspase-9 蛋白的表达

Expression of caspase-9 protein and UCP2 gene in renal tissues of rats with different degrees of iodine deficiency

田秀标¹, 代永红¹, 阎玉琴², 林来祥², 裴玉梅¹, 房 辉^{1*}

1. 河北医科大学唐山临床医学院唐山市工人医院内分泌二科, 唐山 063000

2. 天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070

[摘要] **目的:**观察不同碘缺乏大鼠肾组织 UCP2、caspase-9 蛋白的表达,探讨二者表达的相关性。**方法:**雌性 Wistar 大鼠随机分为轻度缺碘组、重度缺碘组及正常对照组,总碘摄入量分别为 5、1.24、10 $\mu\text{g}/\text{d}$,采用 RT-PCR、免疫组化等方法检测大鼠离体肾脏 UCP2 及 caspase-9 蛋白的表达,并分析二者表达的相关性。**结果:**与正常对照组相比,碘缺乏大鼠肾组织 UCP2 基因、蛋白表达水平下降,caspase-9 蛋白表达增加($P < 0.05$),远端肾小管、髓质肾小管改变更明显;且 caspase-9 蛋白表达与 UCP2 表达负相关。**结论:**碘缺乏导致大鼠肾组织 UCP2 表达下降,可能与凋亡蛋白 caspase-9 表达增加有关。

[关键词] 解偶联蛋白 2;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9;碘缺乏;肾;细胞凋亡

[中图分类号] R 581 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1316-03

解偶联蛋白-2(uncoupling protein-2, UCP2)是细胞内活性氧产生的生理性调节器^[1],普遍存在于人及鼠的心、肾、肺、淋巴细胞、白色脂肪组织、骨骼肌等多种组织细胞中,在能量平衡、体质量和热量调节、细胞凋亡及炎症反应等多方面发挥重要作用^[2-3]。甲状腺激素可通过基因转录和分子水平正向调节 UCP2 表达^[5]。因此,本研究通过改变大鼠碘摄入量调控甲状腺激素水平,观察其对机体肾组织 UCP2 表达的影响,并探讨其与凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(caspase-9)表达的相关性,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 兔抗大鼠 UCP2 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, Bs-0049R 兔抗大鼠 caspase-9 多克隆抗体、SP-002 通用型 SP Kit 广谱免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司, DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物工程有限公司。TRIzol Reagent、RNA PCR 3.0 试剂盒、西班牙琼脂糖、100 bp DNA Ladder Marker 均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 动物分组及处理 30 只 4~5 周龄 Wistar 雌性大鼠, 体质量 70~100 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 随机均分为轻度缺碘组(mild iodine deficiency, MIDG)、重度缺碘组(severe iodine deficiency, SIDG)和正常对照组(control, CL), 饲养 3 个月^[6]。低碘饲料来自河北省兴隆山区重度缺碘地区粮食, 饲料实测含碘量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 天津自来水实测含碘量 8 $\mu\text{g}/\text{L}$, 每升饮水中加入 KI 量各组分别为: 163.8、0、381.7 μg , 按大鼠每日进食 20 g, 进水 30 ml 来估计

每日总碘摄入量分别为: 5、1.24、10 μg 。

1.3 血清 FT₃、FT₄ 水平的测定 处死前取大鼠血清, 采用化学发光法测定大鼠血清 FT₃、FT₄ 水平。

1.4 免疫组化检测大鼠肾脏 UCP2 及 caspase-9 蛋白的表达 取大鼠肾脏纵切/横断, 厚度 < 0.5 cm, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规梯度乙醇脱水, 石蜡包埋后切片(4 μm)。SP 法检测肾脏 UCP2、caspase-9 蛋白表达, 免疫组化染色方法按试剂盒说明书进行操作。结果用 Image-proplus 5.0 专业图像分析系统软件进行分析, 根据累积积分光密度与总面积的比值($\text{IOD}_{\text{sum}}/\text{area}_{\text{sum}}$), 计算单位面积平均光密度。

1.5 RT-PCR 检测大鼠肾脏 UCP2 mRNA 的表达 取 -80℃ 保存的新鲜肾脏实质部组织 100 mg, 利用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 再逆转录成 cDNA, Techne TC-512 梯度 PCR 仪扩增目的基因 UCP2, 利用 β -actin 作为内参照, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后应用 Bio-Rad 2000 采集图像, Quantity One 图像分析系统进行灰度测量, 结果取目的基因与内参的比值进行半定量分析。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体引物序列^[7]见表 1。

RT 反应条件: 50℃ 20 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 1 个循环。PCR 反应条件: 94℃ 2 min 预变性, 94℃ 30 s → 68~64℃ 30 s, 每 1 个循环降 1℃ → 63~62℃ 30 s 每 5 个循环降 1℃; 61~60℃ 30 s 每 6 个循环降 1℃; 59℃ 30 s 3 个循环; 58℃ 30 s 2 个循环 → 72℃ 延伸 30 s 共 32 个循环, 72℃ 10 min。 β -actin 反应条件: 94℃ 2 min 预变性, 94℃ 30 s → 57℃ 30 s → 72℃ 30 s 共 28 个循环, 72℃ 10 min。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处

[收稿日期] 2009-04-07 **[接受日期]** 2009-07-30

[基金项目] 国家自然科学基金(30671816), Supported by National Natural Science Foundation of China(30671816).

[作者简介] 田秀标, 硕士生, E-mail: txb11@yahoo.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0315-3722505, E-mail: fanghui@medmail.com.cn

理与统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析、*F* 检验, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, 指标间相关性用 Pearson 相关系数表示。

表 1 引物序列

基因	引物(5'-3')	退火温度 $\theta/^\circ\text{C}$	基因序列号	长度(bp)
UCP2				
Sense	TAA AGC AGT TCT ACA CCA AGG G	56.9	AF039033	360
Antisense	CGA AGG CAG AAG TGA AGT GG	58.1		
β -actin				
Sense	CAT CAC TAT CGG CAA TGA GC	56.3	J00691	156
Antisense	GAC AGC ACT GTG TTG GCA TA	54.7		

2 结果

2.1 各组大鼠血清激素水平的比较 结果(表 2)表明: 随着碘缺乏逐渐加重, 甲状腺激素水平也逐渐降低。与正常对照

组相比, SIDG 组 FT_4 、 FT_3 明显降低 ($P < 0.01$)。结果说明低碘饮食可以导致大鼠血甲状腺激素水平降低, 且饮食中含碘量越低激素水平下降越明显。

表 2 各组大鼠血清 FT_4 、 FT_3 、caspase-9 蛋白、UCP2 蛋白和 UCP2 基因表达的比较

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	FT_4 $c_B/(\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1})$	FT_3 $c_B/(\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Caspase-9(IOD/area)		UCP2(IOD/area)		UCP2/ β -actin
			肾小球	肾小管	肾小球	肾小管	
CL	29.27 ± 0.95	2.99 ± 0.10	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.01	1.30 ± 0.09
MIDG	27.54 ± 1.57	2.72 ± 0.22*	0.21 ± 0.01*	0.20 ± 0.02**	0.21 ± 0.02*	0.23 ± 0.02**	1.13 ± 0.10**
SIDG	11.38 ± 1.74* $\Delta\Delta$	2.28 ± 0.22* $\Delta\Delta$	0.25 ± 0.03* $\Delta\Delta$	0.25 ± 0.03* $\Delta\Delta$	0.17 ± 0.02* Δ	0.19 ± 0.02* $\Delta\Delta$	0.70 ± 0.19* $\Delta\Delta$

MIDG: 轻度缺碘组; SIDG: 重度缺碘组; CL: 正常对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 CL 组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 与 MIDG 组比较

2.2 各组大鼠肾脏 caspase-9 蛋白表达情况 结果(图 1)表明: 与 CL 相比, MIDG、SIDG 组大鼠肾小球、远端肾小管及髓质肾小管 caspase-9 蛋白表达增加, 远端肾小管与髓质肾小管改变尤甚, 且 SIDG 组更明显。结果(表 2)表明: 髓质肾小管

各组间具有统计学意义 ($P < 0.05$); 肾小球除 MIDG 与 CL 组间无统计学差异, 余各组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果说明碘缺乏可以导致肾小球、远端肾小管及髓质肾小管上皮细胞凋亡蛋白 caspase-9 表达增加。

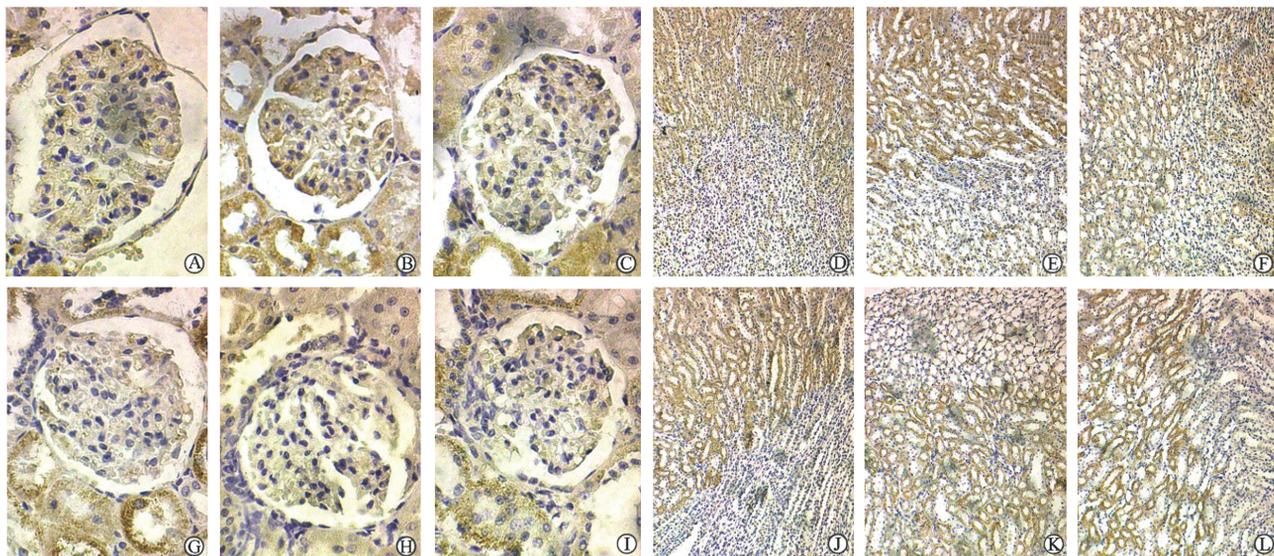


图 1 各组大鼠肾组织 caspase-9 (A-F)、UCP2(G-L) 蛋白的表达

A-C, G-I: 肾小球; D-F, J-L: 肾小管. Original magnification: $\times 400$ (A-C, G-I); $\times 100$ (D-F, J-L)

2.3 各组大鼠肾脏 UCP2 基因及蛋白表达情况 结果(图 2、表 2)发现: 伴随碘缺乏加重 UCP2 mRNA 表达量降低越

明显; 除 MIDG 与 CL 组间无统计学差异外, 余各组间均具有统计学差异 ($P < 0.05$)。免疫组化结果(图 1、表 2)发现: 与

CL相比,MIDG、SIDG组大鼠肾小球、远端肾小管及髓质肾小管UCP2蛋白表达减少,SIDG组更加明显;除MIDG与CL组间肾小球、髓质肾小管无统计学差异外,余各组间均有统计学差异。结果说明碘缺乏可以导致大鼠肾脏UCP2基因与蛋白表达下降。

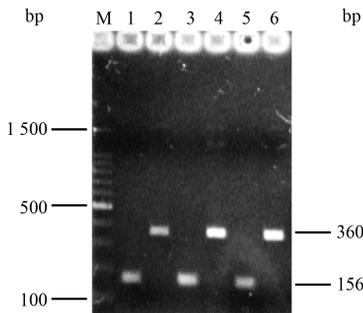


图2 UCP2基因表达产物

M:100 bp DNA Ladder marker; 1:SIDG β -actin组; 2:SIDG UCP2组; 3:MIDG β -actin组; 4:MIDG UCP2组; 5:CL β -actin组; 6:CL UCP2组

2.4 大鼠肾脏UCP2与caspase-9表达的相关性分析 结果表明UCP2/ β -actin与肾小球、髓质肾小管caspase-9蛋白明显负相关,相关系数分别为-0.665、-0.920。肾小球、髓质肾小管UCP2蛋白与caspase-9蛋白明显负相关,相关系数分别为-0.605、-0.709。结果表明凋亡蛋白caspase-9表达增加与UCP2基因、蛋白表达下降密切相关。

3 讨论

UCP2除参与能量代谢、脂类代谢、调节胰岛素分泌、动脉粥样硬化、巨噬细胞介导的免疫应答和炎症过程等外,还与细胞凋亡密切相关^[8-9]。Caspase-9属于线粒体通路凋亡的启动者,在细胞凋亡过程中发挥重要作用。碘缺乏可导致子代大鼠海马细胞凋亡^[10]以及甲状腺细胞凋亡^[11],且对甲状腺激素有明显影响,而甲状腺激素对UCP2具有正向调节作用。本研究旨在通过测定UCP2基因的表达、肾小球及肾小管细胞caspase-9蛋白的改变,探讨不同碘缺乏大鼠肾组织凋亡蛋白caspase-9的改变与UCP2的关系。

本研究结果表明低碘饮食使大鼠血甲状腺激素水平、肾脏UCP2基因与蛋白表达下降,且SIDG组比MIDG组下降更明显。免疫组化结果显示碘缺乏导致大鼠肾小球、肾小管caspase-9蛋白表达增加,而且远端肾小管及髓质肾小管更加明显,且与UCP2基因、蛋白表达下降密切相关。各种因素诱导的细胞凋亡均出现线粒体功能紊乱,UCP2可通过降低线粒体跨膜电位,增加电子传递比率,减少活性氧的产生^[12]。近期研究^[1,13]发现UCP2不但具有抗凋亡作用,而且这种作用与氧化应激直接相关;而甲状腺激素缺乏/甲减可导致包括肾脏在内组织器官的氧化损伤^[14]。结果提示低碘饮食可能通过减弱大鼠肾组织UCP2基因与蛋白的表达使线粒体ROS生成增加,诱导凋亡蛋白caspase-9表达增加,具体机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Lee K U, Lee I K, Han J, Song D K, Kim Y M, Song H S, et al. Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis[J]. *Circ Res*, 2005, 96:200-207.
- [2] Fleury C, Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31:1261-1278.
- [3] Hang T, Jiang S, Wang C, Xie D, Ren H, Zhuge H. Apoptosis and expression of uncoupling protein-2 in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy[J]. *Acta Cardiol*, 2007, 62:461-465.
- [4] Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9[J]. *Structure*, 2002, 10:285-288.
- [5] Solanes G, Pedraza N, Calvo V. Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region[J]. *Biochem J*, 2005, 386(Pt 3):505-513.
- [6] Schröder-van der Elst J P, van der Heide D, Kastelijin J, Rousset B, Obregón M J. The expression of the sodium/iodide symporter is up-regulated in the thyroid of fetuses of iodine-deficient rats [J]. *Endocrinology*, 2001, 142:3736-3741.
- [7] 杨年红, 王重建, 许明佳, 胡学锋, 郝丽萍, 刘烈刚, 等. UCPs和PPAR γ 2基因在饮食诱导大鼠肥胖抵抗中的作用[J]. *卫生研究*, 2005, 34:556-558.
- [8] Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, Hengge U R. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2[J]. *Cell Signal*, 2008, 20:311-322.
- [9] Zhang K, Shang Y, Liao S, Zhang W, Nian H, Liu Y, et al. Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360:327-332.
- [10] 李远慧, 杨勤, 粟多顺, 马启玲, 杨里福, 庄宗杰. 缺碘子代大鼠海马细胞凋亡的形态学研究[J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22:492-494.
- [11] 林来祥, 叶振坤, 聂秀玲, 叶艳, 阎玉芹, 陈祖培. 碘对大鼠甲状腺细胞凋亡及bax、bcl-2基因mRNA表达的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 2005, 24:245-247.
- [12] Hong Y, Fink B D, Dillon J S, Sivitz W I. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142:249-256.
- [13] Kim J E, Kim Y W, Lee I K, Kim J Y, Kang Y J, Park S Y. AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106:394-403.
- [14] Torun A N, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk B O, Isbilen E, Tutuncu N B. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 70:469-474.