

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00846

· 论 著 ·

凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 及细胞色素 C 在链脲佐菌素糖尿病大鼠肾组织内的表达

吴学平¹, 李玉磊¹, 金晓梅^{1*}, 彭彦霄¹, 贾雪梅²

1. 皖南医学院组织学与胚胎学教研室, 芜湖 241002

2. 安徽医科大学人体显微形态学中心实验室, 合肥 230032

[摘要] **目的** 观察糖尿病大鼠肾组织中促凋亡基因 Bax、凋亡抑制基因 Bcl-2 及细胞色素 C (cytochrome C, cytC) 的表达变化。**方法** 雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为糖尿病组和正常对照组, 每组 12 只。糖尿病组给予 2% 链脲佐菌素 (溶于 pH 4.4, 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液) 按 65 mg/kg 单次腹腔注射, 复制糖尿病模型。正常对照组只注射相当体积的枸橼酸缓冲液。分别于 4 周、12 周后测体质量、尿蛋白、血糖、血清尿素氮及血清肌酐水平。用 H-E 染色观察肾形态学变化, 免疫组织化学染色观察 Bax、Bcl-2 和 cytC 蛋白表达变化, TUNEL 法观察大鼠肾皮质细胞凋亡情况。**结果** 与正常对照组比较, 糖尿病组大鼠 24 h 尿蛋白、血糖、尿素氮及肌酐水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。糖尿病组大鼠 4 周时肾小球体积增大, 12 周时肾小球系膜基质增生和肾小球硬化, 肾小管上皮细胞空泡样变。随病程延长, 糖尿病组大鼠肾小管上皮细胞 Bax 及 cytC 表达增加, 而 Bcl-2 表达减弱。细胞凋亡检测结果显示, 糖尿病组大鼠 4 周时凋亡细胞增多, 多数在远曲肾小管, 12 周时远曲肾小管及近曲肾小管均可见凋亡细胞。**结论** Bax 及 cytC 表达随糖尿病病程延长而增强, 引起细胞凋亡增加, 导致肾功能异常, 这可能是糖尿病肾病的重要发病机制。

[关键词] 糖尿病肾病; Bax; Bcl-2; 细胞色素 C 类; 肾**[中图分类号]** R 587.24**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0846-05

Expressions of apoptosis-related gene Bax, Bcl-2 and cytochrome C in renal tissue of streptozotocin-induced diabetic rats

WU Xue-ping¹, LI Yu-lei¹, JIN Xiao-mei^{1*}, PENG Yan-xiao¹, JIA Xue-mei²

1. Department of Histology and Embryology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

2. Microscopic Morphological Center Laboratory, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To observe the changes in expressions of apoptosis-promoting gene Bax, apoptosis-inhibiting gene Bcl-2, and cytochrome C in the renal tissue of diabetic rats. **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 groups ($n=12$): normal control group and diabetic group. Diabetic models were induced by single intraperitoneal injection of 2% streptozotocin (dissolved in pH 4.4, 0.1 mol/L citric acid sodium buffer, 65 mg/kg). Normal control group was only injected with same volume of folic buffer. Animals were sacrificed at the 4th and 12th week, and body mass, 24-hour urine protein, blood glucose, blood urine nitrogen and serum creatinine were determined. The changes of the renal morphology were observed by H-E staining. Immunohistochemical method was used to investigate the expressions of Bax, Bcl-2 and cytochrome C protein. The apoptosis of renal cortex cells was determined by TUNEL method. **Results** Compared with normal control group, the 24-hour urine protein, blood glucose, blood urine nitrogen and serum creatinine were significantly increased in the diabetic group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The size of glomerulus was increased in diabetic rats during the 4th week; hyperplasia of renal glomerulus mesangial matrix, glomerular sclerosis, and vacuolar degeneration in renal tubular epithelial cells were observed during the 12th week. With disease progression in the diabetic group, the expressions of Bax and cytochrome C were increased and the expression of Bcl-2 was decreased. Apoptosis tests showed increased apoptotic cells in the 4th week, mostly in both the distant tubular epithelial cells; in the 12th week, apoptotic cells were seen in both the distant tubular and proximal tubules. **Conclusion** Renal expression of Bax and cytochrome C gradually increases with the progression of diabetes, inducing

[收稿日期] 2012-03-20**[接受日期]** 2012-05-25**[基金项目]** 安徽省教育厅高等学校省级优秀青年人才基金 (2010SQRL174). Supported by Foundation for Excellent Young Talents of Higher Institution of Education Department, Anhui Province (2010SQRL174).**[作者简介]** 吴学平, 硕士, 讲师. E-mail: wuxueping2003019@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0553-3932468, E-mail: xiaomeijin6@gmail.com

apoptosis of more cells and leading to renal dysfunction, which may partly contribute to the diabetic nephropathy in diabetic rats.

[Key words] diabetic nephropathies; Bax; Bcl-2; cytochromes C; kidney

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8): 846-850]

糖尿病肾病(diabetes nephropathy, DN)是糖尿病患者最常见的微血管并发症,也是导致患者死亡的主要原因之一,研究发现细胞凋亡与 DN 的发生密切相关^[1]。促凋亡基因 Bax、凋亡抑制基因 Bcl-2 及线粒体呼吸链细胞色素 C(cytochrome C, cytC)参与细胞凋亡的调节^[2-3],但它们在糖尿病肾脏内的表达变化及其与 DN 间的关系目前尚不清楚。本研究拟通过腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)复制糖尿病大鼠动物模型,采用 H-E 染色、原位末端标记(TUNEL)法和免疫组织化学 SABC 方法研究糖尿病发生过程中肾组织细胞凋亡与 Bax、Bcl-2 和 cytC 表达的关系,为探讨 Bax、Bcl-2 及 cytC 在 DN 发病机制中的作用及意义提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型复制 取体质量为(195.83±18.00) g 雄性 SD 大鼠 24 只(南京医科大学实验动物中心提供,普通级),随机分为糖尿病组 12 只和正常对照组 12 只(4 周、12 周各 6 只),正常对照组只注射相当体积的枸橼酸缓冲液。糖尿病组按 65 mg/kg 单次腹腔注射 2% STZ(美国 Sigma 公司,溶于 pH 4.4、0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)。各组动物分笼饲养,均不限制饮食饮水。48 h 后尾静脉取血,血糖>16.7 mmol/L、尿糖(++~卅)则确定为模型建立成功。所有动物均建模成功。

1.2 标本采集 于成模第 4 周和第 12 周末,分别用代谢笼收集 24 h 尿标本,用于尿蛋白(Upro24)的测

定。SD 大鼠称体质量,腹腔注射戊巴比妥麻醉,剖开腹腔,迅速从下腔静脉取血。采用快速血糖测试仪(美国强生公司)进行血糖检测;采用比色法检测血清肌酐(Scr;试剂盒购自北京九强生物技术有限公司)和血清尿素氮(BUN;试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司)。取左肾后称质量,分别剪成小块固定。

1.3 H-E 染色 切片经脱蜡、染色、脱水、透明和封片,进行组织学观察。

1.4 免疫组织化学染色 一抗为兔抗大鼠的 Bax、Bcl-2 和 cytC 抗体,按 1:100 稀释,37℃ 孵育 1 h 后,置 4℃ 过夜;二抗为即用型生物素化羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h;即用型 SABC 复合物 37℃ 孵育 1 h。三者均购自武汉博士德生物工程有限公司。标本用 DAB 显色后,脱水、透明和封片,光镜下观察。

1.5 TUNEL 法测定细胞凋亡 凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。显微镜下观察凋亡出现的部位,随机选取 5 个高倍视野(×400),计算每个视野细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。AI(%)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 *t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠的体质量和血糖 与同期正常对照组比较,糖尿病组大鼠体质量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),血糖升高($P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 各组大鼠体质量、血糖检测结果

Tab 1 Blood glucose and body mass in each group

Group	Body mass <i>m</i> /g		Blood glucose <i>c_B</i> /(mmol·L ⁻¹)	
	4 th week	12 th week	4 th week	12 th week
	Control	305.50±34.67	367.33±26.73	7.23±0.84
DN	229.83±55.44*	156.50±10.13**	23.31±6.81**	27.79±9.28**

n=6, $\bar{x} \pm s$

DN: Diabetes nephropathy. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 两组大鼠的肾功能变化 与同期正常对照组比较,糖尿病组大鼠 4 周、12 周时 Upro24、Scr 和 BUN 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表 2)。

2.3 H-E 染色结果 正常对照组大鼠肾小球及肾

小管组织正常(图 1A);4 周糖尿病组大鼠出现肾小球毛细血管充血、扩张,肾小囊腔减小,甚至消失(图 1B);12 周糖尿病组出现肾小球系膜基质增生和肾小球硬化,远曲小管扩张,上皮细胞空泡样变(图 1C)。

表 2 各组大鼠 Upro24、Scr 和 BUN 的变化

Tab 2 The changes of Upro24, Scr and BUN in each group

Group	Upro24 m/mg		Scr $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		BUN $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	4 th week	12 th week	4 th week	12 th week	4 th week	12 th week
	Control	7.21±0.61	7.47±0.26	57.34±10.32	60.07±12.38	8.93±1.45
DN	16.20±0.66*	21.80±2.76**	79.98±13.47*	81.68±12.43**	14.80±2.53*	19.27±2.39**

$n=6, \bar{x} \pm s$

DN: Diabetes nephropathy; Upro24: 24-hour urine protein; Scr: Serum creatine; BUN: Blood urea nitrogen. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

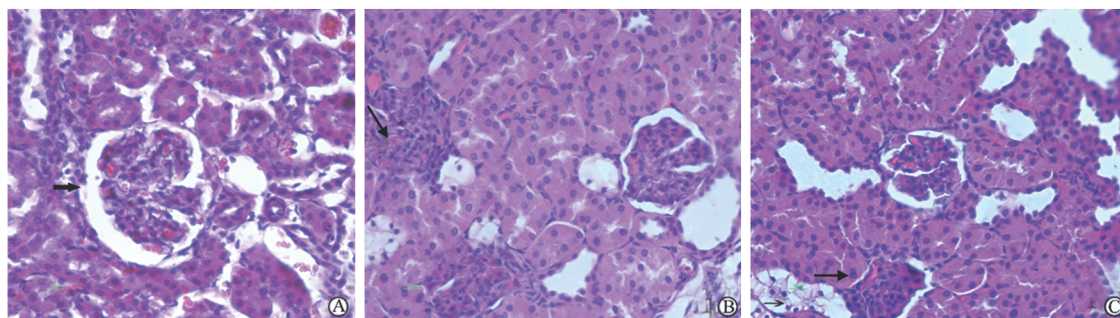


图 1 大鼠肾组织病理学改变(H-E 染色)

Fig 1 Histopathology changes of rat renal tissues (H-E staining)

DN: Diabetes nephropathy. A: Control group (12th week); B: DN group (4th week); C: DN group (12th week). Arrows indicate rat kidney glomerulus. Original magnification: $\times 200$

2.4 Bax、Bcl-2 及 cytC 半定量检测结果 在 12 周大鼠肾切片中,正常对照组(图 2A)肾小管上皮细胞 Bcl-2 表现为强阳性, Bax 和 cytC 免疫反应为弱阳性(图 2D、2G),免疫反应产物均匀分布于胞质内,细胞核和肾小球呈阴性反应。与对照组 12 周时比较,4 周糖尿病组 Bcl-2(图 2B)、Bax(图 2E)和 cytC(图 2H)免疫反应为中等阳性;12 周糖尿病组 Bcl-2 表现为弱阳性(图 2C),而 Bax(图 2F)、cytC(图 2I)免疫反应为强阳性。与对照组比较,4 周、12 周糖尿病组肾小管上皮细胞内 Bcl-2 平均光密度值降低, Bax 和 cytC 平均光密度值升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$,表 3)。

2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡情况 由图 3 可见,正常对照组 12 周时凋亡细胞较少;糖尿病组 4 周时凋亡明显增多,多数在远曲肾小管,12 周时远曲肾小管和近曲肾小管均可见凋亡细胞,肾小管的凋亡细胞数随病程呈增多趋势,肾小球未见凋亡细胞。糖尿病组大鼠肾小管细胞 AI 随病程延长而升高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$,表 3)。

3 讨论

本研究发现糖尿病大鼠 Upro24、Scr 及 BUN 水平随病程延长而升高,引起肾损害和功能障碍。有关 DN 的病因和发病机制目前尚未完全阐明。长期高血糖引起的细胞因子表达失衡、氧化应激以及由此引起的肾血流动力学改变在 DN 病程中起着非常

重要的作用^[5]。有文献报道凋亡主要发生在增生的肾小球,引起肾小球细胞和足细胞减少导致 DN^[1],而本研究通过 TUNEL 技术对糖尿病大鼠肾组织进行检测,结果显示:随糖尿病病程延长,糖尿病组肾小管凋亡细胞数明显增多, AI 升高($P<0.05, P<0.01$),表明糖尿病肾细胞凋亡主要发生于肾小管上皮细胞(与文献^[4]报道一致),从而导致糖尿病大鼠肾脏受损,肾小管上皮细胞凋亡可能是 DN 的发生机制之一。

细胞凋亡参与糖尿病多种并发症的发生^[6-7]。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促凋亡基因,细胞内 Bax 与 Bcl-2 的比值影响凋亡的发生, Bcl-2/Bax 比值增加则细胞凋亡减少;反之,则诱发细胞凋亡机制的启动。本研究显示正常大鼠肾组织有大量 Bcl-2 表达和少量 Bax 表达,在糖尿病组中,随着病程延长, Bcl-2 蛋白表达逐渐减少, Bax 蛋白表达逐渐增加, Bax/Bcl-2 比值增大, AI 升高,表明糖尿病肾小管细胞凋亡可能为 Bax/Bcl-2 所调控,这与文献^[1,8]认为 Bax/Bcl-2 蛋白间的比例是影响细胞凋亡程度重要因素的结论相一致。高血糖可促使细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,导致氧化应激增强^[5],进而使 Bcl-2 表达减少,促使凋亡的发生。本研究中糖尿病大鼠高血糖持续 3 个月,随糖尿病病程延长, Bcl-2 蛋白表达减弱,而 Bax/Bcl-2 比值增加,表明肾组织发生了凋亡病变。

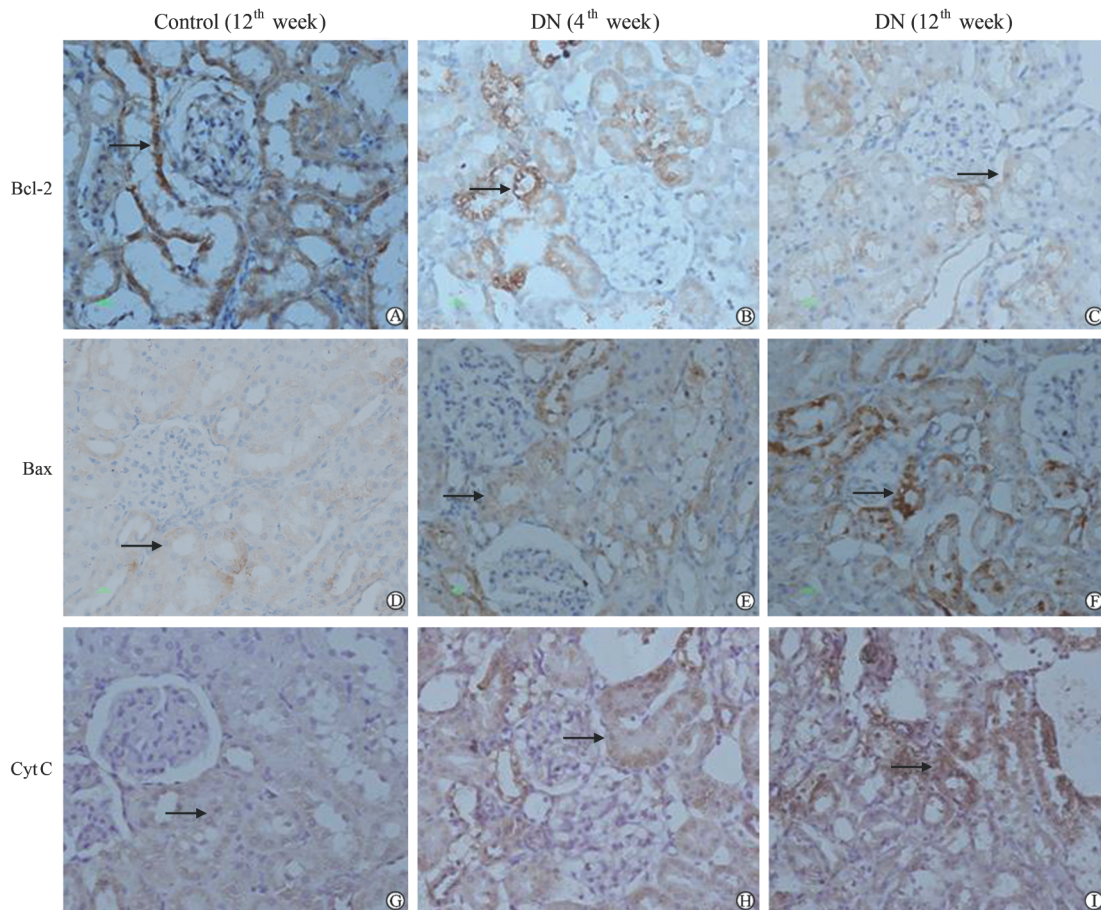


图 2 凋亡相关基因 Bax、Bcl-2、cytC 免疫组化染色结果

Fig 2 Expression of apoptosis-related gene Bax, Bcl-2 and cytC by immunohistochemical staining
 DN: Diabetes nephropathy. Arrows indicate rat kidney tubule epithelial cells. Original magnification: $\times 400$

表 3 各组大鼠肾细胞 AI 及 Bax、Bcl-2、cytC 表达阳性细胞平均光密度值

Tab 3 AI of renal cells and mean optical density values of Bax, Bcl-2 and cytC positive cells in each group

$n=6, \bar{x} \pm s$

Group	AI (%)	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2	CytC
Control (12 th week)	1.30 \pm 0.75	0.252 3 \pm 0.003 5	0.431 7 \pm 0.001 3	0.58	0.242 7 \pm 0.015 6
DN (4 th week)	5.37 \pm 0.65*	0.323 0 \pm 0.003 3*	0.387 6 \pm 0.018 4*	0.83	0.361 2 \pm 0.002 4*
DN (12 th week)	10.36 \pm 0.89**	0.437 4 \pm 0.005 7**	0.235 6 \pm 0.013 4**	1.86	0.416 5 \pm 0.006 8**

DN: Diabetes nephropathy; AI: Apoptosis index. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (12th week)

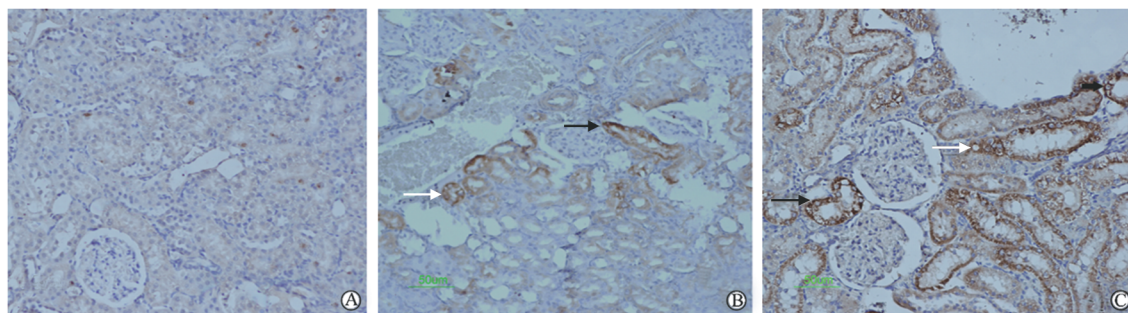


图 3 大鼠肾组织病理学改变(TUNEL 染色)

Fig 3 Histopathology changes of rat renal tissues (TUNEL staining)

A: Control group (12th week); B: DN group (4th week); C: DN group (12th week). Black and white arrows indicate distal tubular and proximal tubule, respectively. Original magnification: $\times 200$

CytC 是线粒体或内在凋亡途径的一种中枢性介质^[9],从线粒体释放到胞浆是多种细胞凋亡的共同表现^[3]。有研究发现糖尿病时 cytC 表达增加促进细胞凋亡^[10],也有证据表明 Bcl-2 家族可增加线粒体膜通透性,致 cytC 释放^[3]参与细胞凋亡。本研究结果显示随病程延长,cytC 与 Bax 表达增加,cytC 表达增强,可能与肾组织中促凋亡因子 Bax 表达增强有关。Bax 可转移到线粒体与 Bcl-2 结合形成异二聚体,促进线粒体释放 cytC,激活细胞凋亡蛋白酶(caspase),使线粒体功能丧失,诱导细胞凋亡^[11-12]。凋亡导致肾小管功能障碍,Upro、Scr 及 BUN 水平随病程延长而升高,造成肾功能进一步恶化,进而导致 DN 的发生。另外,Bcl-2 表达减弱,Bax 表达增强,可促进 Ca^{2+} 离子从内质网释放进入胞核,激活核酸内切酶,使 DNA 断裂,进而诱发凋亡。

本研究结果显示,4 周时糖尿病组大鼠肾出现肾小球体积增大,12 周时糖尿病组大鼠发生肾小球系膜基质增生和肾小球硬化,远曲小管扩张,上皮细胞空泡样变,这种病变是细胞凋亡的具体表现。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Jung D S, Lee S H, Kwak S J, Li J J, Kim do H, Nam B Y, et al. Apoptosis occurs differentially according to glomerular size in diabetic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27:259-266.

[2] Lau G J, Godin N, Maachi H, Lo C S, Wu S J, Zhu J X, et al. Bcl-2 modifying factor induces renal proximal tubular cell apoptosis in diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2012, 61:474-484.

[3] Mizuta T, Shimizu S, Matsuoka Y, Nakagawa T, Tsujimoto Y. A Bax/Bak-independent mechanism of cytochrome c release [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:16623-16630.

[4] Velagapudi C, Bhandari B S, Abboud-Werner S, Simone S, Abboud H E, Habib S L. The tuberlin/mTOR pathway promotes apoptosis of tubular epithelial cells in diabetes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22:262-273.

[5] Zhang Z, Liew C W, Handy D E, Zhang Y, Leopold J A, Hu J, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β -cell apoptosis [J]. *FASEB J*, 2010, 24:1497-1505.

[6] Ares-Carrasco S, Picatoste B, Benito-Martín A, Zubiri I, Sanz A B, Sánchez-Niño M D, et al. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H2109-H2119.

[7] 张建中,侯绍章,景丽,葛新红,赵琳,郭风英,等.实验性糖尿病肾小球的超微结构及其病变分级[J].*解剖学杂志*, 2011, 34:31-34.

[8] Lee J S, Jung W K, Jeong M H, Yoon T R, Kim H K. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway [J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31:70-77.

[9] Choi D, Schroer S A, Lu S Y, Cai E P, Hao Z, Woo M. Redundant role of the cytochrome c-mediated intrinsic apoptotic pathway in pancreatic β -cells [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210:285-292.

[10] 马小茹,周成福,王淑秋,王伟群,刘月霞,王淑湘,等.灵芝孢子粉对 2 型糖尿病大鼠附睾细胞线粒体 Ca^{2+} 细胞色素 C 的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2007, 13:400-402.

[11] Del Re D P, Miyamoto S, Brown J H. RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 8069-8078.

[12] Borutaite V, Brown G C. Mitochondrial regulation of caspase activation by cytochrome oxidase and tetramethylphenylenediamine via cytosolic cytochrome c redox state [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:31124-31130.

[本文编辑] 周燕娟,孙岩