

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00218

· 短篇论著 ·

## 碘缺乏大鼠肾脏 c-Jun 表达上调

### Increased expression of c-Jun in renal tissues in iodine deficient rats

代永红<sup>1</sup>, 房 辉<sup>2\*</sup>, 田秀标<sup>3</sup>

1. 河北省玉田县医院内分泌科, 玉田 064100

2. 唐山工人医院内分泌二科, 唐山 063000

3. 天津市大港油田总医院糖尿病科, 天津 300280

**[摘要]** **目的** 观察碘缺乏大鼠肾脏的损伤情况及核转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)亚单位 c-Jun 在肾组织中的表达差异,探讨低碘地区肾脏损伤的可能发病机制。**方法** 给予 Wistar 大鼠缺碘饲料,通过饮用含不同浓度碘的水分为重度缺碘组、轻度缺碘组和正常对照组,3组每日总碘摄入量分别约为 1.24、5、10  $\mu\text{g}$ 。测定甲状腺功能状态,利用 H-E 染色观察肾脏病理变化,利用 RT-PCR、免疫组化方法分析肾脏组织中 AP-1 亚单位 c-Jun 在基因和蛋白水平表达的差异。**结果** 重度缺碘组与轻度缺碘组、对照组比较  $\text{TT}_3$ 、 $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  均明显下降( $P < 0.01$ ),轻度缺碘组与对照组相比  $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$  明显下降( $P < 0.01$ ), $\text{TT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  稍有降低但差异无统计学意义。缺碘大鼠肾小球系膜区扩大,肾小球面积减小,随缺碘程度增加而加重。对照组大鼠肾组织可少量表达 c-Jun,重度缺碘组与轻度缺碘组大鼠肾组织中 c-Jun 在基因及蛋白水平表达均增强,且重度缺碘组与轻度缺碘组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 碘缺乏大鼠甲状腺激素分泌减少,肾脏发生损伤,肾组织 c-Jun 表达上调。

**[关键词]** 碘缺乏;甲状腺激素;c-Jun;肾损伤**[中图分类号]** R 591.9**[文献标志码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0218-03

地方性甲状腺肿和克汀病是严重缺碘地区人群中的多发病,尤其是克汀病,会造成靶组织及靶器官的损害,其对于肾脏结构和功能的损害已被大量临床工作所证实,并且日益受到人们的关注。核转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是近年来发现的重要转录因子,其介导的信号转导途径在多种肾脏损害中均有高表达,对肾损伤的发生及转归具有重要作用<sup>[1-3]</sup>。为探讨缺碘地区肾脏损伤的可能发病机制,我们在成功复制低碘大鼠动物模型的基础上,研究了碘缺乏大鼠肾脏中 AP-1 的亚单位 c-Jun 的表达情况,现报告如下。

### 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** 血清甲状腺激素测定试剂盒为德国拜耳公司产品;TRIzol 试剂、RT-PCR 试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品;PCR 引物为上海生工生物工程技术有限公司合成;兔抗大鼠 c-Jun 多克隆抗体、SP-002 通用型 SP kit 广谱免疫组化试剂盒为北京博奥森生物技术有限公司产品;DAB 显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

**1.2 大鼠分组及模型复制** 健康 Wistar 大鼠 30 只,4~5 周龄,体质量 70~100 g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。适应喂养 1 周后,随机分为轻度缺碘组、重度缺碘组和正常对照组,每组 10 只。模型制作参照文

献[4],3组大鼠均给予低碘饲料饲养,通过给予含不同浓度碘的饮水进行分组。低碘饲料来自河北省兴隆山区重度缺碘地区粮食,饲料配方:每公斤饲料含黄豆 40%、玉米 30%、无机盐 40~80 g、水溶性维生素 20~40 g、脂溶性维生素 5 g、甲硫氨酸 3 g、赖氨酸 1 g,饲料的含碘量 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。饮水实测含碘量为 8  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,每升饮水中加入 KI 量:重度缺碘组 0  $\mu\text{g}$ ,轻度缺碘组 163.8  $\mu\text{g}$ ,对照组 381.7  $\mu\text{g}$ ,按大鼠每日进食 20 g、进水 30 ml 来估计 3 组每日总碘摄入量分别为 1.24、5、10  $\mu\text{g}$ 。喂养 8 周后自股动脉取血并放血处死动物,留血清、肾脏等组织冻存于 -80℃ 冰箱中备用。

**1.3 甲状腺激素测定** 采用化学发光免疫分析方法测定血清  $\text{TT}_3$ 、 $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  的水平。

**1.4 肾脏病理形态学的观察** 对 3 组大鼠肾脏组织进行切片,H-E 染色,在光镜下观察其形态学变化。

**1.5 肾组织 c-Jun 的检测**

**1.5.1 免疫组化** 大鼠肾组织石蜡包埋后切片,切片厚 4  $\mu\text{m}$ ,应用 SP 法检测肾组织中 c-Jun 的激活变化情况,一抗为兔抗大鼠 c-Jun 多克隆抗体,稀释浓度为 1:150。结果判定:c-Jun 阳性反应为胞质内可见棕褐色细颗粒。每份标本测定 20 个肾小球,随机选择肾皮质小管及髓质小管各 10 个视野,测定染色阳性区域的累积光密度与面积,根据二者的比值,计算单位面积平均光密度,取其均值计算每个标本肾小球及肾小管的平均光密度,以各组的均值进行组间比较。

**[收稿日期]** 2009-07-18**[接受日期]** 2009-11-25**[作者简介]** 代永红,硕士,主治医师, E-mail: ytdyh@126.com

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

1.5.2 RT-PCR 取 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存的新鲜肾脏组织,利用 TR-Izol 一步法抽提总 RNA,再反转录成 cDNA。c-Jun 引物序列:上游 5'-CCA GCA ATG GGC ACA TCA CC-3',下游 5'-CGT CTG CGG CTC TTC CTT CA-3',产物长度 455 bp。内参照 $\beta$ -actin引物序列:上游 5'-CAT CAC TAT CGG CAA TGA GC-3',下游 5'-GAC AGC ACT GTG TTG GCA TA-3',产物长度 156 bp。c-Jun 扩增参数:预变性  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $96^{\circ}\text{C}$  30 s,  $66^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 30 个循环;总延伸  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。 $\beta$ -actin 扩增参数:预变性  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $96^{\circ}\text{C}$  30 s,  $66^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 25 个循环;总延伸  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中分离,凝胶成像系统拍照分析,计算特异扩增条带的总光密度值,结果取目的基因与 $\beta$ -actin 的比值进行半定量分析。

1.6 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠甲状腺功能比较 重度缺碘组  $\text{TT}_3$ 、 $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  分别为  $(0.56 \pm 0.08)$  nmol/L、 $(9.28 \pm 2.36)$  nmol/L、 $(2.32 \pm 0.20)$  pmol/L、 $(11.94 \pm 1.64)$  pmol/L, 低于对照组的  $(0.98 \pm 0.16)$  nmol/L、 $(48.50 \pm 3.36)$  nmol/L、 $(2.98 \pm 0.13)$  pmol/L、 $(28.82 \pm 1.28)$  pmol/L, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。轻度缺碘组  $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$  分别为  $(35.91 \pm 3.79)$  nmol/L、 $(2.76 \pm 0.21)$  pmol/L, 低于对照组 ( $P < 0.01$ ),  $\text{TT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  分别为  $(0.84 \pm 0.06)$  nmol/L、 $(27.58 \pm 1.54)$  pmol/L, 与对照组比较稍有降低但差异无统计学意义。重度缺碘组与轻度缺碘组相比  $\text{TT}_3$ 、 $\text{TT}_4$ 、 $\text{FT}_3$ 、 $\text{FT}_4$  均明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2.2 肾脏病理学改变 在光镜下观察 H-E 染色切片, 与对照组相比, 轻度缺碘组肾小球系膜区扩大, 肾小球面积减小。重度缺碘组比轻度缺碘组变化更加明显(图 1)。

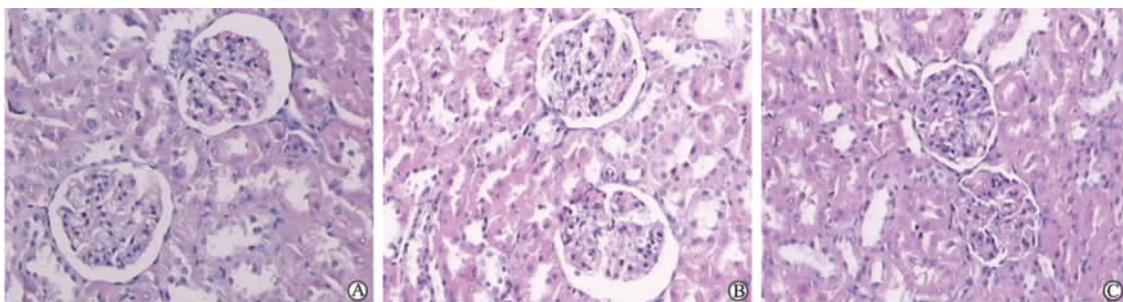


图 1 3 组大鼠肾脏的组织形态学改变(H-E)

A: 对照组; B: 轻度缺碘组; C: 重度缺碘组。Original magnification:  $\times 100$

2.3 免疫组化检测 c-Jun 的表达 免疫组化结果如图 2 所示。(1) c-Jun 在肾小球中的表达: 重度缺碘组  $(0.32 \pm 0.04)$  与对照组  $(0.25 \pm 0.03)$  相比显著增高 ( $P < 0.01$ )。轻度缺碘组  $(0.27 \pm 0.03)$  与对照组相比有增高趋势, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。重度缺碘组与轻度缺碘组相比显著增高

( $P < 0.01$ )。(2) c-Jun 在肾小管中的表达: 重度缺碘组  $(0.19 \pm 0.03)$  与对照组  $(0.15 \pm 0.02)$  相比显著增高 ( $P < 0.01$ )。轻度缺碘组  $(0.17 \pm 0.03)$  与对照组相比有增高趋势, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。重度缺碘组与轻度缺碘组相比显著增高 ( $P < 0.01$ )。

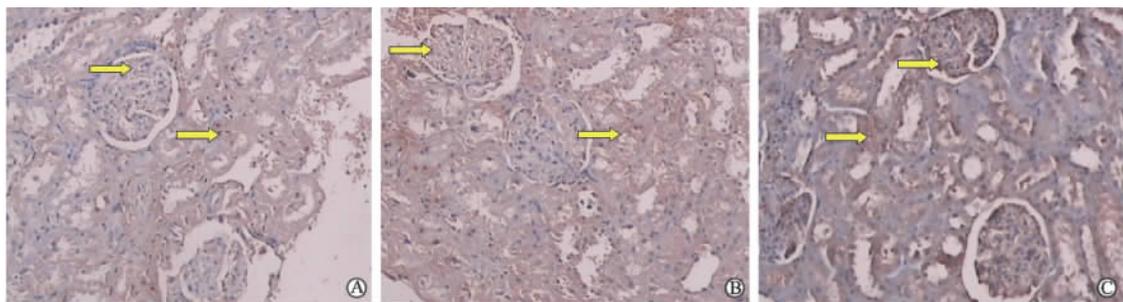


图 2 3 组大鼠肾组织中 c-Jun 蛋白表达(SP)

A: 对照组; B: 轻度缺碘组; C: 重度缺碘组。箭头示 c-Jun 阳性表达区。Original magnification:  $\times 100$

2.4 RT-PCR 如图 3 所示, c-Jun mRNA 在对照组大鼠肾组织中有基础量的表达  $(0.98 \pm 0.07)$ , 重度缺碘组  $(1.30 \pm 0.18)$  与对照组相比表达明显增高 ( $P < 0.01$ ); 轻度缺碘组  $(1.00 \pm 0.09)$  与对照组相比表达有增高趋势, 但差异无统计学意义; 重度缺碘组与轻度缺碘组相比明显增高 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

碘对生命的意义是通过甲状腺激素的生理作用来体现的, 而甲状腺激素在各个器官系统的代谢、生长和发育成熟中起着十分重要的作用。甲状腺激素水平降低可引起血清

肌酐浓度恒定升高<sup>[5]</sup>,并影响肾脏近端小管的渗透性、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>转运体活性、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性,从而影响了钠和水的代谢<sup>[6]</sup>。此外,可引起肾小球上皮细胞变性,血中单核细胞大量浸润系膜区,同时系膜细胞大量增殖<sup>[7]</sup>。Salomon等<sup>[8]</sup>通过肾活检发现,甲状腺激素减低可引起肾小球和肾小管基底膜增厚,内皮细胞、间质细胞包涵物增加、系膜扩大。本研究发现碘缺乏大鼠甲状腺激素减低,肾小球系膜区扩大,肾小球面积减小,与上述研究结果相一致,推测碘缺乏造成的肾损伤主要是由甲状腺功能减退引起的。

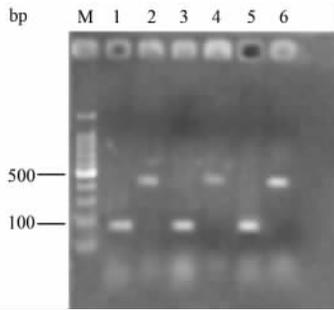


图3 3组大鼠肾组织中 c-Jun mRNA 的表达

M:Marker; 1:对照组 β-actin; 2:对照组 c-Jun; 3:轻度碘缺乏组 β-actin; 4:轻度碘缺乏组 c-Jun; 5:重度碘缺乏组 β-actin; 6:重度碘缺乏组 c-Jun

Sawant等<sup>[9]</sup>研究发现,甲状腺激素不足可引起肾脏组织氧化应激反应增强,SOD活性显著降低,GPx活性明显增强,CAT活性无明显变化,而血浆GPx活性明显降低。Poncin等<sup>[10]</sup>研究发现,缺碘大鼠体内氧化应激反应及抗氧化因子水平同时升高,但后者升高幅度低,不足以对抗氧化应激反应。研究发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可引起AP-1的活化<sup>[11]</sup>,抗氧化剂apocynin可阻断Ang II上调神经细胞中c-Fos、c-Jun蛋白表达的作用<sup>[12]</sup>,说明氧化应激参与了AP-1的激活。

AP-1是主要由Jun和Fos两大类蛋白质因子家族组成的同源或异源二聚体。其中Jun蛋白占绝大部分,包括c-Jun、Jun-B、Jun-D等,可以与任何AP-1家族因子结合形成同源或异源二聚体。Fos蛋白家族包括c-fos、Fos-B、Fra-1、Fra-2等,只可以与Jun家族之间形成异源二聚体。因此我们选用AP-1的亚单位c-Jun进行RT-PCR和免疫组化的检测较能反映AP-1的激活情况。本研究发现,缺碘大鼠肾组织中c-Jun在基因及蛋白水平表达均增强,与缺碘程度有依赖关系,缺碘程度愈高,其表达愈强。

综上所述,碘缺乏可导致甲状腺功能减退性肾损伤,其作用机制可能与上调c-Jun的表达激活了肾组织中AP-1通路信号转导途径有关。

[参考文献]

- [1] Mezzano S A, Barria M, Droguett M A, Burgos M E, Ardiles L G, Flores C, et al. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease[J]. *Kidney Int*, 2001, 60:1366-1377.
- [2] Zheng L, Sinniah R, Hsu S I. Pathogenic role of NF-kappaB activation in tubulointerstitial inflammatory lesions in human lupus nephritis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56:517-529.
- [3] Jadhav A, Torlakovic E, Ndisang J F. Hemin therapy attenuates kidney injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296:F521-F534.
- [4] Schröder-van der Elst J P, van der Heide D, Kastelijns 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.
- [5] Kreisman S H, Hennessey J V. Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism[J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159:79-82.
- [6] Baum M, Quigley R. Thyroid hormone modulates rabbit proximal straight tubule paracellular permeability[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286:F477-F482.
- [7] Sokkar S M, Soror A H, Ahmed Y F, Ezzo O H, Hamouda M A. Pathological and biochemical studies on experimental hypothyroidism in growing lambs[J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2000, 47:641-652.
- [8] Salomon M I, Di Scala V, Grishman E, Brenner J, Churg J. Renal lesions in hypothyroidism: a study based on kidney biopsies[J]. *Metabolism*, 1967, 16:846-852.
- [9] Sawant B U, Nadkarni G D, Thakare U R, Joseph L J, Rajan M G. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in kidney of hypothyroid and hyperthyroid rats[J]. *Indian J Exp Biol*, 2003, 41:1334-1337.
- [10] Poncin S, Gérard A C, Boucquey M, Senou M, Calderon P B, Knoop B, et al. Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content[J]. *Endocrinology*, 2008, 149:424-433.
- [11] Ryoo S W, Kim D U, Won M, Chung K S, Jang Y J, Oh G T, et al. Native LDL induces interleukin-8 expression via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62:185-193.
- [12] Liu D, Gao L, Roy S K, Cornish K G, Zucker I H. Role of oxidant stress on AT1 receptor expression in neurons of rabbits with heart failure and in cultured neurons[J]. *Circ Res*, 2008, 103:186-193.

[本文编辑] 孙岩