

Expression of Autophagy in Pancreas of Type 1 Diabetic Rats

Deju Ma Huihui Wang Hongjuan Xi Qinglu Wang

Qilu Medical University, Zibo, Shandong, 255314, China

Abstract

Objective: To explore the expression of autophagy in pancreas of diabetic rats and its relationship with the occurrence and development of diabetes mellitus. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into diabetic group and normal control group. Streptozotocin was injected intraperitoneally in diabetic group and saline was injected intraperitoneally in normal control group. After the model was successfully prepared, the pancreas was quickly taken and stored in a refrigerator at -80 °C for PCR and Western blot detection. **Results:** The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that Atg4b and Bnip3 were mRNA in pancreas of diabetic rats. The expression of LC3 in the control group was higher than that of the normal control group ($P < 0.05$). Western blot was used to detect the expression of LC3 in the normal control group, and the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Autophagy is involved in the process of pancreatic injury in rats.

Keywords

diabetes; pancreatic; autophagia

自噬在 1 型糖尿病大鼠胰腺中的表达

马德菊 王慧慧 郝红娟 王清路

齐鲁医药学院, 中国·山东 淄博 255314

摘要

目的: 探索自噬在糖尿病大鼠胰腺中的表达意义及其与糖尿病发生发展的关系。**方法:** 将 40 只 SD 大鼠随机分为糖尿病组和正常对照组, 糖尿病组腹腔注射链脲佐菌素, 正常对照组腹腔注射生理盐水, 注射后鼠尾采血查空腹血糖水平。模型制备成功后, 速取胰腺, 置于 -80 °C 冰箱保存, 留待做 PCR 和 Western blot 检测。**结果:** 实时荧光定量 PCR 结果发现: Atg4b 和 Bnip3 在糖尿病大鼠胰腺中的 mRNA 低于正常对照组; Beclin1 和 Vps34 高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Western blot 检测 LC3 的表达量模型组小于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 自噬参与了大鼠胰腺损伤的过程。

关键词

糖尿病; 胰腺; 自噬

1 引言

糖尿病是一种常见病多发病, 以胰腺 B 细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏, 或胰岛素抵抗为主伴胰岛素相对性缺乏或胰岛素分泌受损为主伴胰岛素抵抗形式的疾病。2014 年 WHO 估计全球有 4.22 亿成人患有糖尿病, 其中中国占 1/4, 预测到 2030 年糖尿病将成为全球第七大死亡原因^[1]。自噬是一种吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物的过程, 藉此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新^[2-3]。有研究称糖尿病的环境下自噬介导了 DNA 的损伤和胰岛细胞的凋亡, 同时自噬又

能被糖尿病的高胰岛素所抑制, 显示自噬与糖尿病之间关系密切^[4]。本研究通过制备糖尿病模型, 借助 PCR 和 Western blot 检测技术检测糖尿病大鼠胰腺与正常大鼠胰腺中自噬相关基因和蛋白的表达水平, 探讨自噬在糖尿病大鼠致胰腺损伤的机制。

2 材料与方法

2.1 实验动物、试剂和仪器

选取健康 8 周龄 SD 大鼠, 雌雄不拘, 体重 200-250g, 由山东济南金丰实验动物有限公司提供, 链脲佐菌素 (STZ) 购于 Sigma 公司; 引物、TRIzol 总 RNA 提取试剂、LC3 一抗

和二抗均购自武汉三鹰生物技术公司；qPCR 预混液购于碧云天生物技术研究所。

2.2 实验动物分组与模型制作

将 40 只 SD 大鼠随机分成两组，糖尿病组（DM 组，20 只）与正常对照组（NC 组，20 只）。所有大鼠均给予标准饲料、自由饮水，标准笼饲养，每笼 5 只。将链脲佐菌素溶于 0.1 mol/L 柠檬酸钠 / 柠檬酸缓冲液中配成 1% STZ 溶液。DM 组按照 65 mg / kg 的剂量腹腔注射 1%STZ 溶液，正常组腹腔注射等量的 0.1 mol / L 柠檬酸钠 / 柠檬酸缓冲液。所有大鼠完成注射后，给予相同的生活环境和喂养条件。在注射 STZ 前及注射后 3- 7 d ，大鼠尾静脉采血使用快速血糖仪检测空腹血糖。空腹血糖水平大于 16.7 mmol / L 的大鼠视为 1 型糖尿病大鼠造模成功。造模成功后 2 周使用 20% 氨基甲酸乙酯按 7ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠，速取胰腺。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测自噬相关基因

按照 Trizol 说明书提取 DM 组和 NC 组胰腺组织总 RNA，并检测 RNA 的浓度和纯度，琼脂糖凝胶电泳检测完整性。逆转录过程使用 cDNA 合成试剂盒，按照说明书配成 20μl 反应体系，引物序列见表 1。反应在普通 PCR 仪上进行，循环 40 次。不同引物的反应程序恒温段都为 95° C 20s；Atg4b 循环段为：95° C 15s ， 54° C 20s ， 72° C 30s。Beclin1 循环段：95° C 15s ， 62° C 20s ， 72° C 30s。Bnip3 循环段：95° C 15s ， 55° C 20s ， 72° C 30s。Vps34 循环段：95° C 15s ， 56° C 20s ， 72° C 30s。以 β-action 引物作为内参校正，恒温段：95° C 20s；循环时与目的基因一致。以 5 种基因的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行统计学分析。

表 1 Atg4b、 Beclin1、 vps34、 Bnip3 和 β-action 引物核苷酸序列

基因名称	上游 (5'→3')	下游 (5'→3')
Atg4b	AGAGCCCGTTGGATACT	GTCGATGAATGCGTTGAG
Beclin1	CAAGATCCTGGACCGTGTC	TGGCACTTCTGTGGACATCA
Vps34	GGACCTTCTGACCACGAT	GCAACAGCATAACGCCTC
Bnip3	ATGGGATTGGTCAAGTCG	AAGGTGCTGGTGGAGGTT
β-action	CTTTTGTGCCTTGATAGTTC	GAGTCCTTCTGACCATAC

2.4 Western Blot 检测自噬表达水平

按说明书提取组织蛋白，测定蛋白浓度，定容至 25μl，灌胶、上样、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、封膜，暗室曝光显影。以微观相关蛋白 LC3 的表达水平胰腺组织中的自噬水平，所

得结果扫描，利用 Image-Pro Plus 软件分析灰度。

2.5 数据分析

应用统计软件 SPSS 17.0 做统计分析，定量资料以均数 ± 标准差表 (x ± s) 表示，采用配对 t 检验，以 P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 显示

Atg4b、Bnip3 在糖尿病大鼠胰腺中的 mRNA 低于正常对照组，差异有统计学意义 (P < 0.05)；Beclin1、Vps34 在糖尿病大鼠胰腺中的含量也高于正常对照组，其中 Bnip3 有统计学差异 (P < 0.05)，Vps34 有显著统计学差异 (P < 0.01) 见表 2。

表 2 Atg4b、 Beclin1、 vps34、 Bnip3 在胰腺的相对定量分析

组别	Atg4b	Beclin1	Vps34	Bnip3
糖尿病组	29.70 ± 1.67*	2.83 ± 0.32*	0.07 ± 0.00**	0.44 ± 0.07*
正常对照组	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01

注：与对照组相比，*P < 0.05；与对照组相比，**P < 0.01。

3.2 Western Blot 结果显示

与正常对照组相比，糖尿病大鼠的 LC3 表达低，见图 1。做统计学分析，有显著性差异 (P < 0.05)，见表 3。

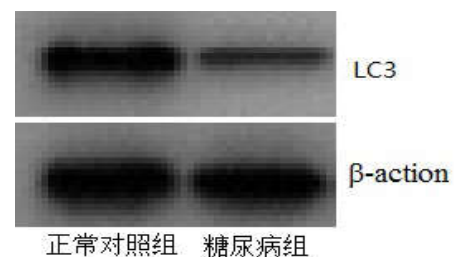


图 1 LC3- II 表达水平

表 3 LC3- II /β-action 灰度值的相对定量分析

组别	LC3- II /β-action
糖尿病组	0.72 ± 0.04*
正常对照组	0.18 ± 0.02

注：与对照组相比，*P < 0.05

4 讨论

自噬广泛参与细胞各种生命活动，其主要功能表现在以下几个方面：（1）通过吞噬受损细胞器、蛋白质、核苷酸等细胞成分，并将其降解为氨基酸、脂肪酸、单核苷酸从而为应激条件下的细胞提供必需能量，抵抗凋亡，帮助细胞在恶

劣环境中存活。(2) 自噬通过吞噬降解衰老细胞器、大分子及细胞质成分维持细胞稳态, 在细胞衰老、肿瘤发生中具有重要意义。(3) 自噬能够吞噬线粒体和过氧化物酶体, 具有抑制活性氧 (ROS) 的功能。(4) 在细胞无法继续存活的情况下, 自噬能够诱导细胞发生凋亡。作为保护细胞自身的一种机制, 过弱或者过强的自噬都可能引起细胞的死亡。

目前发现的自噬相关基因 (autophagy related genes, Atg) 已达 31 种。在哺乳动物细胞中 Atg4 有四个家族成员: Atg4a、Atg4b、Atg4c、Atg4d。Atg4 能让 Atg8-PE 去脂化, 促使自噬体与溶酶体融合, 参与调控自噬整个过程。自噬小体的形成是自噬发生和完成的关键调控步骤, 它的形成需要满足两个条件: 一是定位内质网膜的 Vps34 激活催化 PI 生成 Pi3p, Pi3p 在内质网膜局部的富集造成自噬前体的发生, 所以 Vps34 对经典自噬和非经典自噬的启动至关重要^[5]。自噬相关基因 Atg6 在哺乳动物被称为 Beclin1, 是自噬发生与调控的关键蛋白, 可调控自噬前体的形成, 引导相关蛋白定位于自噬体膜, 并且调节细胞自噬与凋亡之间的平衡^[6]。Beclin1 可通过激活 Vps34 来加强自噬过程。Bnip3 基因在在缺氧和营养缺乏时可诱导细胞发生程序性死亡, 即细胞凋亡, 另外, Bnip3 还可增强细胞线粒体的自噬能力^[7]。研究发现, 在转染了 Bnip3 的细胞中很早就出现了线粒体损害、过多的细胞质空泡和线粒体的自噬现象^[8]。本研究结果显示, Atg4b 和 Bnip3 在糖尿病大鼠胰腺中的 mRNA 低于正常对照组; Beclin1 和 Vps34 高于正常对照组, 从而证实自噬参与了糖尿病致胰腺损伤的过程。LC3 是自噬的标志蛋白, 经过修饰后分为 LC3-I 和 LC3-II, 为酵母 ATG8 的同系物, 定位于前自噬体和自噬体^[8], 由于 LC3-II 特异性地结合到新生自噬体上, LC3-II 含量与自噬泡数量呈正比^[9]。Kaniuk 等^[10]发现, 自噬可清除由氧化应激导致的泛素化及胰岛 B 细胞胞质中储存的蛋白质聚集物, 证实自噬在高血糖导致的细胞损伤中发挥防御作用。本研究发现, LC3 的表达量模型组小于正常对照组, 说明自噬的缺乏导致了大鼠胰腺的损伤。

5 结语

综上所述, 本研究发现胰腺的损伤与自噬有着密切的关系, 自噬水平下降可能是造成糖尿病发生发展的原因。通过对自噬这种细胞死亡方式的研究希望能为糖尿病的发病提供理论依据。应用药物或基因治疗的手段找到合适的靶点, 将是治疗糖尿病的关键。

参考文献

- [1] WHO. Global report on diabetes[EB/OL]. <http://www.who.int/diabetes/global-report/en,2016-01-01>.
- [2] Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*. 2009 May 15; 34(3):259-69.
- [3] Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008 Aug; 4(6):740-3.
- [4] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec; 36(12):2503-18.
- [5] Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009 May; 34(3):259-69.
- [6] Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 2008 Aug; 4(6):740-3.
- [7] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008 Jan; 132(1):27-42.
- [8] Jin WY, Qiang X, Ke T, et al. Severe Global Cerebral Ischemia-Induced Programmed Necrosis of Hippocampal CA1 Neurons in Rats is prevented by 3-Methyladenine: A Widely Used Inhibitor of Autophagy[J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4):314-322.
- [9] Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* 2006 Apr-Jun(2):85-90.
- [10] Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, et al. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy[J]. *Diabetes*. 2007 Apr; 56(4):930-9.