

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.01.003

健康成人白细胞中 LC3 基因表达水平的年龄相关性研究^{*}

闫波 黄建 逢淑超 张俊平

(济宁医学院山东省心脏疾病诊疗重点实验室, 济宁医学院附属医院中心实验室, 山东 济宁 272029)



闫波,男,1964 年 2 月生于山东泗水。1979 级校友,博士生导师,教授、主任医师,现任济宁医学院山东省心脏疾病诊疗重点实验室主任、济宁医学院—乔治华盛顿大学联合转化医学实验室主任,济宁医学院附属医学中心实验室主任和乔治华盛顿大学医学院教授。系济宁医学院 79 届临床医学系毕业生,重庆医科大学 87 届临床医学系硕士,中国医学科学院基础医学院 93 届医学分子生物学博士(师从刘德培院士),美国国立卫生研究院医学分子遗传学博士后。研究方向为心脏疾病分子遗传学和临床转化医学。

摘要 目的 自噬是真核细胞内的一种主要消化降解途径。动物实验研究表明细胞的自噬功能随年龄增长逐渐下降,但在人体内尚未见系统性研究报道。因此,我们对健康成人外周血白细胞的自噬活性与年龄相关性进行了探讨。**方法** LC3 基因是自噬过程中的关键基因之一,其编码蛋白经过修饰后形成的耦合蛋白 LC3-II 是自噬体和自噬溶酶体的膜标记蛋白。在该研究中,我们在基因表达和蛋白水平上,检测健康成人外周血白细胞中 LC3 基因的表达水平,并在不同年龄组之间,以及同一年龄组不同性别之间进行了比较和分析。**结果** 外周血白细胞中 LC3 基因的表达水平随年龄增长呈现逐渐下降趋势。其中,70 岁以上年龄组 LC3 基因表达水平显著低于 40~49 岁年龄组($P<0.05$)。与之相反,70 岁以上年龄组的 LC3-II 蛋白水平显著高于 40~49 岁年龄组($P<0.05$)。在同一年龄组中男性和女性之间,LC3 基因表达水平和 LC3-II 蛋白水平未见显著性差异。**结论** 本研究结果提示健康成人外周血白细胞自噬体的形成和自噬功能随年龄增长逐渐下降。LC3-II 蛋白水平随年龄增长逐渐升高提示细胞消化降解该蛋白的能力下降,导致其在细胞内沉积而致。因此,应用药物等手段增强细胞 LC3 的基因表达水平,可延缓细胞的衰老过程。

关键词 自噬体;年龄;成人;LC3;白细胞

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)02-009-05

Age-related alterations of the LC3 gene expression in human leukocytes

YAN Bo, HUANG Jian, PANG Shu-chao, et al

(Shandong Key Laboratory of Diagnosis and Treatment of Heart Diseases, Central Laboratory of Affiliated Hospital, Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective Autophagy is one of major degradative pathway in eukaryotic cells. In experimental animals, autophagic activities are decreased in aging. However, few studies on autophagic activities in human tissue and cells have been reported. **Methods** LC3 gene plays a critical role in autophagy. LC3 protein is modified and conjugated to form LC3-II, a membrane marker for autophagosomes and autophagolysosomes. The levels of LC3 gene expression and LC3-II protein were examined in the peripheral leukocytes from healthy human subjects, and compared between different age groups or males and females in the same age group. **Results** Age-related decrease of LC3 gene expression was observed. In over 70-years group, LC3 gene expression levels were significantly lower than that in 40-44 years group. In contrast, LC3-II protein levels were increased in an age-dependent manner. In over 70-years group, LC3-II protein levels were significantly higher than that in 40-44 years group. No significant difference of LC3

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:81070173), 山东省自然科学基金项目(编号:ZR2010HL030)资助

gene expression and LC3-II protein levels was obtained between males and females in the same age group. **Conclusion**

Our data indicated an age-related decrease of LC3 gene expression in human leukocytes. Increased LC3-II protein levels may be caused by insufficient lysosomal degradation, leading to accumulation of autophagosomes and autophagolysosomes. Therefore, enhancement of LC3 gene expression with medicine and other approaches may delay the cellular aging and be effective for the treatment of age-related human diseases.

Key words: Autophagy; Aging; Adult; LC3; Leukocytes

自噬 (autophagy) 是细胞内消化降解生存时间长、构型和功能异常的大分子物质和受损的细胞器等的主要途径之一, 是从低等动物到人类细胞的一个保守功能^[1]。自噬主要分为 3 种类型, 巨自噬 (macroautophagy)、微自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy)。目前对巨自噬 (其后简称为自噬) 的研究报道较多, 也较深入。在自噬过程中, 自噬泡首先形成, 然后将细胞内成分包裹形成自噬体。自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 其成分由酸性溶酶体消化分解, 然后细胞再利用。细胞的自噬功能与发育、衰老、免疫等生理过程密切相关。近年来研究发现, 自噬功能异常与炎症、神经退行性疾病、肿瘤和扩张性心肌病等相关^[2]。

已经研究表明, 自噬过程参与细胞和器官的衰老, 自噬功能的降低多伴有衰老过程的加速^[3]。在正常老龄化的人脑组织中, 数个自噬相关基因 (ATG5、ATG7 和 Beclin1) 的表达水平降低。在组织特异性自噬相关基因敲除的小鼠中, 观察到类似与衰老相关的人类疾病的表型。采用节食或者药物诱导和增强细胞的自噬功能, 可以减缓动物的衰老, 并延长其寿命。目前对衰老过程中人体细胞和组织中的自噬功能系统性的研究尚未见报道。

迄今为止, 在哺乳动物中已克隆出 20 余个自噬相关基因。微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3), 即酵母 Atg8 基因的哺乳类同源基因, 是自噬体形成的关键基因之一^[4]。LC3 基因编码大分子 LC3 前体蛋白, 经过修饰形成胞浆型蛋白 (LC3-I), 然后进一步修饰耦联形成 LC3-II 蛋白, 后者紧密结合并定位于自噬体膜上。在目前研究中, LC3-II 蛋白已作为自噬体和自噬溶酶体的标记蛋白。在本研究中, 我们采用半定量 PCR 和 western blot 对成人外周血白细胞中 LC3 基因的表达水平和蛋白水平进行了检测和分析。

1 材料和方法

1.1 健康群体

总共 260 名健康成人, 来自于济宁医学院附属

医院健康体检中心。临床生化指标如三酰甘油、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的测定在自动生化分析仪上进行 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany)。该项研究经由济宁医学院附属医院学术和伦理委员会批准。

1.2 血液样本采集和白细胞分离

早晨空腹条件下采取外周静脉血 (10ml), 存于肝素抗凝试管中。应用白细胞分离液分离白细胞, 细胞沉淀直接裂解进行 RNA 和蛋白制备。

1.3 RT-PCR 检测

应用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取白细胞总 RNA。应用逆转录试剂盒 (SuperScript II first-strand synthesis system, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 和 1.0 μ g 总 RNA 进行逆转录生成 cDNA。然后, 经 PCR 反应扩增 DNA 片段。PCR 引物序列如下: LC3, 正向 5'-CCACACCCAAAGTCCTCACT-3', 反向 5'-CACTGCTGCTTTCCGTAACA-3' (DNA 片段长度 220bp, 30 循环); beta-actin, 正向 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', 反向 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (DNA 片段长度 234bp, 25 循环)。经琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 溴化乙锭染色后进行扫描定量测定 PCR 产物 (LC3 和 beta-actin) 密度值。以 beta-actin 作为内对照, 计算出 LC3 的相对水平 (LC3/beta-actin,) 进行比较和分析。每个样品重复测定 3 次。

1.4 Western blot 分析

于冰上裂解沉淀白细胞, 裂解液成分如下: 10mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM 氯化钠, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 5mM EDTA 和复合蛋白酶抑制剂 (Roche, Mannheim, Germany)。以 Bio-Rad 蛋白浓度测定试剂盒 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 测定细胞蛋白浓度。采用 western blot 半定量测定 LC3-II 蛋白水平, 取细胞蛋白 (30 μ g) 在蛋白分离胶 (Nu-PAG[®] E 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA)上分离,然后转移到硝酸纤维素膜上。膜封闭后,与兔抗人 LC3 抗体(H-50)或者鼠抗人 beta-actin 抗体(C4,Santa Cruz Biotechnologies,Santa Cruz,CA,USA)相结合,然后与辣根过氧化物酶标记的第二抗体(羊抗兔 IgG-HRP 或者羊抗鼠 IgG-HRP)结合,最后进行显色反应(Santa Cruz Biotechnologies,Santa Cruz,CA,USA)。以 beta-actin 为内对照,将显色反应带扫描进行密度测定后,计算出 LC3-Ⅱ蛋白的相对水平(LC3-Ⅱ/beta-actin)。

1.5 统计学分析

生化等定量指标表示为 $M \pm SD$ 。定量指标之间对比采用 t 检验,频率之间对比采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 定为统计学显著性差异。

2 结果

不同年龄组健康成人的体检和生化检测结果总结如表 1。其中,在 65~69 岁年龄组中,男性比例显著高于 45~49 岁和 55~59 岁年龄组($P < 0.05$)。在 55~59 岁年龄组中,三酰甘油水平显著高于 45~49 岁年龄组($P < 0.05$)。在不同年龄组之间,未见身体体重指数(BMI)、吸烟、高血压和糖尿病比率、总胆固醇、高密度脂蛋白—胆固醇和低密度脂蛋白—胆固醇水平的显著性差异。

为探讨不同年龄组成人外周血白细胞中的自噬过程,我们将健康成人分为 7 个年龄组:40~44 岁,45~49 岁,50~54 岁,55~59 岁,60~64 岁,65~69 岁和 79 岁以上。采用 RT-PCR 检测 LC3 基

因的表达水平。结果如图 1A 和 B 所示,LC3 基因的表达水平(LC3 的 mRNA 水平)随着年龄的增长逐渐降低。在 70 岁以上成人白细胞中,LC3 基因的表达水平显著低于 40~44 岁组($P < 0.05$)。在其它年龄组之间,未见 LC3 基因表达水平的显著性差异($P > 0.05$)。另外,我们将健康成人分为 40~49 岁、50~59 岁、60~69 岁和 70 岁以上组,在每个年龄组中进行男性和女性之间比较分析 LC3 基因的表达水平。结果显示同一年龄组内男性和女性的 LC3 基因表达水平未见显著性差异($P > 0.05$,图 1C)。

为在蛋白水平上探讨 LC-Ⅲ水平的变化,我们亦将健康成人分为 7 个年龄组:40~44 岁,45~49 岁,50~54 岁,55~59 岁,60~64 岁,65~69 岁和 79 岁以上。由于 LC3-Ⅱ蛋白位于自噬体和自噬溶酶体的膜上,其蛋白水平与细胞内自噬体形成相关。采用 western blot 检测和分析 LC3-Ⅱ蛋白的水平,结果见图 2。与 LC3 基因表达水平的变化趋势相反,LC3-Ⅱ蛋白的水平随年龄增长逐渐升高(图 2A 和 B)。其中,70 岁以上年龄组成人白细胞的 LC3-Ⅱ蛋白水平显著高于 40~44 岁年龄组($P < 0.05$)。同样,我们将健康成人分为 40~49 岁、50~59 岁、60~69 岁和 70 岁以上组,在每个年龄组中进行男性和女性之间比较分析 LC3-Ⅱ蛋白的水平。结果显示同一年龄组内,不同性别之间的 LC3-Ⅱ蛋白水平未见显著性差异($P > 0.05$,图 2C)。

表 1 不同年龄健康人群的体检和生化检测指标

年龄组	40~44 岁 (n=43)	45~49 岁 (n=37)	50~54 岁 (n=43)	55~59 岁 (n=50)	60~64 岁 (n=28)	65~69 岁 (n=36)	70 岁~ (n=26)
男性 (%)	52.3%	45.9%	55.8%	46.0%	53.6%	72.2% *	50.0%
BMI(体重指数)	25.8±3.3	24.2±3.5	26.2±2.4	26.4±2.8	22.8±3.0	25.3±3.5	28.2±3.5
吸烟 (%)	22.7%	27.0%	34.9%	26.0%	28.6%	38.8%	19.2%
高血压 (%)	20.5%	27.0%	32.6%	30.0%	25.0%	22.2%	23.1%
糖尿病 (%)	6.8%	2.7%	7.0%	8.0%	3.6%	5.6%	3.8%
TG(mmol/L)	1.24±0.90	1.17±0.53	1.23±0.52	1.51±0.61‡	1.19±0.95	1.45±0.48	1.42±1.27
TC(mmol/L)	5.03±0.70	5.32±0.88	5.29±0.83	5.31±0.25	4.99±0.62	5.36±0.55	5.19±0.99
HDL-C(mmol/L)	1.34±0.40	1.38±0.34	1.19±0.29	1.23±0.25	1.25±0.32	1.19±0.43	1.35±0.36
LDL-C(mmol/L)	2.96±0.46	3.14±0.59	3.09±0.56	3.15±.031	2.90±0.59	3.01±0.49	2.97±0.60

* $P < 0.05$,与 45~49 岁和 55~59 岁年龄组相比;‡ $P < 0.05$,与 45~49 岁年龄组相比。

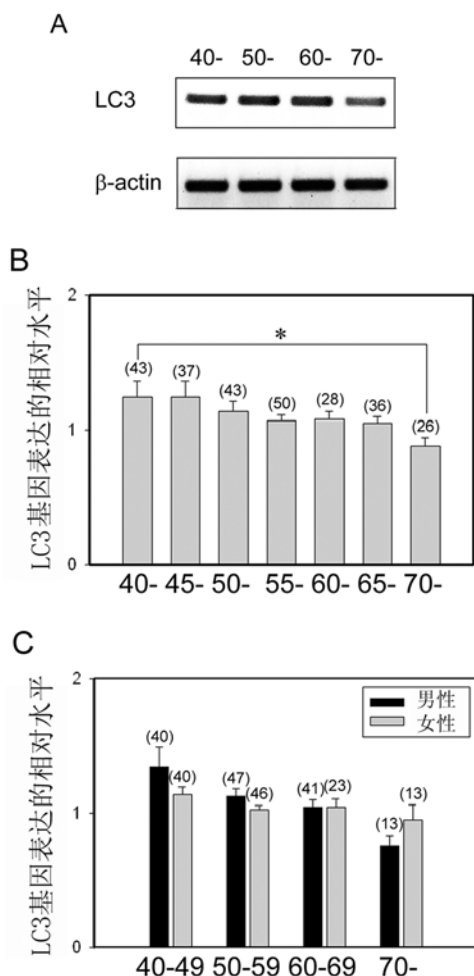


图1 外周血白细胞内LC3基因表达的相对水平
A:琼脂糖凝胶分离的RT-PCR产物(溴化乙锭染色)。数字表示为年龄组。B:不同年龄组LC3基因表达的相对水平。 β -actin作为内对照。 $*P<0.05$ 。C:同一年龄组中不同性别LC3基因表达的相对水平。括号内数字表示样本的大小。

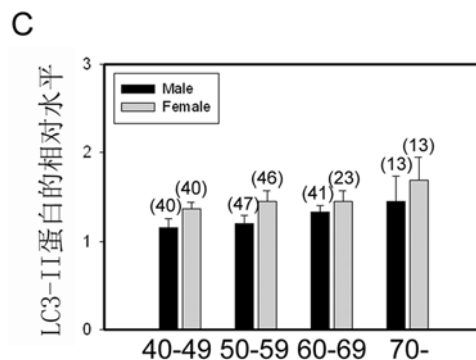
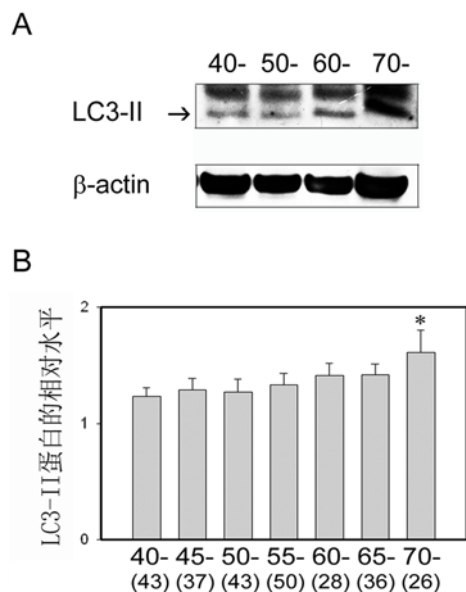


图2 外周血白细胞内LC3-II蛋白的相对水平
A:Western blot分析LC3-II蛋白。数字表示为不同年龄组。B:不同年龄组LC3-II蛋白的相对水平。 β -actin作为内对照。 $*P<0.05$,与40-44岁年龄组相比。C:同一年龄组不同性别的LC3-II蛋白相对水平。括号内数字表示样本的大小。

3 讨论

我们首次探讨和分析不同年龄组健康成人外周血白细胞中LC3基因的表达水平,发现LC3基因表达水平随年龄增加逐渐降低,提示人体细胞内自噬活性随年龄增加而呈逐渐降低趋势。与之相反,LC3-II蛋白水平随年龄增加而逐渐升高,可能是由于LC3-II蛋白及其自噬体内物质在溶酶体内消化降解的速度降低,致使其在细胞内累积而引起。

人类LC3基因定位于第20号染色体上,20q11.22^[5]。目前对LC3基因的表达调控所知不多。在心衰的心肌细胞中,LC3基因的表达显著降低^[6]。在老龄相关性骨关节炎病人体内,检测到LC3基因表达水平的降低^[7]。在体外培养人细胞中,研究表明LC3基因的表达是可以调控的^[8]。因此,应用药物等手段调控LC3基因表达水平,可以达到调控细胞自噬活性的目的。

衰老是由一个由遗传因素和环境因素等参与的缓慢进展的复杂生理过程,细胞和器官功能逐渐减退,其细胞和分子机制不清,可能与细胞异常大分子物质和受损细胞器在细胞内累积有关^[9-10]。自噬体参与细胞的脂质代谢,以及细胞内脂滴的形成等。本研究中,我们观察到与年龄增长相关的LC3基因表达水平的降低,后者引起细胞自噬活性的降低,可能促进人体的代谢衰老过程。

在该项研究中,我们首次报道在健康成人外周血白细胞中,自噬相关基因LC3基因的表达水平随年龄增长呈逐渐下降趋势,提示细胞的自噬活性亦呈年龄相关性降低趋势。因此,应用食物或者药

物等方法上调 LC3 基因表达水平,有望增强细胞的自噬活性,减缓细胞和器官衰老的过程,以防治衰老相关性疾病。

参考文献:

- [1] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1383-1435.
- [2] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [3] Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging[J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682-695.
- [4] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [5] Mann SS, Hammarback JA. Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of mi-

crotubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B[J]. *J Neurosci Res*, 1996, 43(5): 535-544.

- [6] Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading[J]. *Circulation*, 2009, 120(Suppl): S191-197.
- [7] Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 791-801.
- [8] Sun T, Li D, Wang L, Xia L, et al. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 161.
- [9] Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process[J]. *Science*, 2003, 299(5611): 1351-1354.
- [10] Rezzani R, Stacchiotti A, Rodella LF. Morphological and biochemical studies on aging and autophagy[J]. *Ageing Res Rev*, 2012, 11(1): 10-31.

(收稿日期 2012-01-15)

(上接第 4 页)

- [11] Kamisawa, T, Funata, N, Hayashi, Y, et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease[J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38(10): 982-984.
- [12] Björnsson, E, Chari, ST, Smyrk, TC, et al. Immunoglobulin G4 associated cholangitis; description of an emerging clinical entity based on review of the literature[J]. *Hepatology*, 2007, 45(6): 1547-1554.
- [13] Kulaksiz, H, Heuberger, D, Engler, S, et al. Poor outcome in progressive sclerosing cholangitis after septic shock[J]. *Endoscopy*, 2008, 40(3): 214-218.
- [14] Ipaktchi, R, Knobloch, K, Vogt, PM. Secondary sclerosing cholangitis following major burn injury-An underestimated issue in burn care? [J]. *Burns*, 2011, 37(2): 355-6; author reply 356-359.
- [15] Jaeger, C, Mayer, G, Henrich, R, et al. Secondary sclerosing cholangitis after long-term treatment in an intensive care unit; clinical presentation, endoscopic findings, treatment, and follow-up[J]. *Endoscopy*, 2006, 38(7): 730-734.
- [16] Engler, S, Elsing, C, Flechtenmacher, C, et al. Progressive sclerosing cholangitis after septic shock; a new variant of vanishing bile duct disorders[J]. *Gut*, 2003, 52(5): 688-693.
- [17] Kirchner, GI, Scherer, MN, Obed, A, et al. Outcome of patients with ischemic-like cholangiopathy with secondary sclerosing cholangitis after liver transplantation[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46(4): 471-478.
- [18] Ruemmele, P, Hofstaedter, F, Gelbmann, CM. Secondary sclerosing cholangitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6(5): 287-295.
- [19] Vitellas, KM, Keogan, MT, Freed, KS, et al. Radiologic manifestations of sclerosing cholangitis with emphasis on MR-cholangiopancreatography[J]. *Radiographics*, 2000, 20(4): 959-975.
- [20] Sandrasegaran, K, Alazmi, WM, Tann, M, et al. Chemotherapy-induced sclerosing cholangitis[J]. *Clin Radiol*, 2006, 61(8): 670-678.
- [21] Kubota, K, Kato, S, Uchiyama, T, et al. Discrimination be-

tween sclerosing cholangitis-associated autoimmune pancreatitis and primary sclerosing cholangitis, cancer using intra-ductal ultrasonography[J]. *Dig Endosc*, 2011, 23(1): 10-16.

- [22] Nakazawa, T, Naitoh, I, Hayashi, K, et al. Diagnostic criteria for IgG4-related sclerosing cholangitis based on cholangiographic classification[J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(1): 79-87.
- [23] Nakazawa, T, Ohara, H, Sano, H, et al. Cholangiography can discriminate sclerosing cholangitis with autoimmune pancreatitis from primary sclerosing cholangitis[J]. *Gastrointest Endosc*, 2004, 60(6): 937-944.
- [24] Esposito, I, Kubisova, A, Stiehl, A, et al. Secondary sclerosing cholangitis after intensive care unit treatment: clues to the histopathological differential diagnosis[J]. *Virchows Arch*, 2008, 453(4): 339-345.
- [25] Chapman, R, Fevery, J, Kalloo, A, et al. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis[J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 660-678.
- [26] Church, NI, Pereira, SP, Deheragoda, MG, Sandanayake, N, et al. Autoimmune pancreatitis: clinical and radiological features and objective response to steroid therapy in a UK Series[J]. 2007, 102: 2417-2425.
- [27] Alazmi, WM, McHenry, L, Watkins, JL, et al. Chemotherapy-induced sclerosing cholangitis; long-term response to endoscopic therapy[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2006, 40(4): 353-357.
- [28] Kato, Y, Matsubara, K, Akiyama, Y, et al. Chemotherapy-induced sclerosing cholangitis as a rare indication for resection: report of a case[J]. *Surg Today*, 2009, 39(10): 905-908.
- [29] Clendenon, JN, Aranda-Michel, J, Krishna, M, et al. Recurrent liver failure caused by IgG4 associated cholangitis[J]. *Ann Hepatol*, 2011, 10(4): 562-564.
- [30] Chung, DT, Tang, CN, Lai, EC, et al. Immunoglobulin G4-associated sclerosing cholangitis mimicking cholangiocarcinoma[J]. *Hong Kong Med J*, 2010, 16(2): 149-152.
- [31] Kulaksiz, H, Heuberger, D, Engler, S, et al. Poor outcome in progressive sclerosing cholangitis after septic shock[J]. *Endoscopy*, 2008, 40(3): 214-218.

(收稿日期 2012-02-20)