

褪黑素延缓糖尿病大鼠肾脏细胞衰老的机制研究

陈永昕, 刘婉卿, 周青, 汪渊, 王怡, 朱华庆

摘要 目的 观察褪黑素(MLT)对糖尿病肾病(DN)大鼠的影响,探究MLT延缓大鼠DN进程的作用机制。方法 SD雄性大鼠15只随机分成正常组、模型组、MLT组,每组各5只。模型组及MLT组采用腹腔注射法给予链脲佐菌素(STZ) 55 mg/kg,建立DN大鼠模型。成功建立模型后,MLT组采用腹腔注射给予MLT 10 mg/(kg·d),正常组与模型组给予等体积生理盐水。连续给药16周后,取大鼠腹主动脉血及肾脏组织,检测血清中尿素氮(BUN)、血肌酐(SCR);Masson染色观察肾脏组织形态学变化; β -半乳糖苷酶染色(SA- β -gal)检测肾脏细胞衰老变化;采用Western blot法检测肾脏组织中自噬标志物(p62、LC3B)、肌球蛋白轻链激酶(MLCK)及细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)抑制因子(p16、p53和p21)的表达水平。结果 与正常组比较,模型组血清中BUN、SCR水平升高,肾间质纤维化明显,肾脏组织自噬水平降低,MLCK、p16、p53、p21表达水平均升高。给予MLT后,与模型组比较,MLT组血清中BUN、SCR水平降低,肾脏组织衰老延缓,病理损伤明显减轻,肾脏组织自噬水平也得到改善,MLCK、p16、p53、p21表达水平均降低。结论 MLT可以通过增强自噬、延缓衰老进而改善DN大鼠的DN进程。关键词 糖尿病肾病;自噬;褪黑素;p16;p53;MLCK
中图分类号 R 587
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1032-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.006

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的发病机制和原因较为复杂,其特征是血流动力学和代谢因素的相互作用,包括高血糖水平、晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)和肾素-血管紧张素-醛固酮系统(rein-angiotensin-aldosterone-system, RAAS)的激活,是慢性肾病(chronic

kidney disease, CKD)的主要病因。在DN晚期,肾功能丧失则会引发终末期肾病(end stage renal disease, ESRD), ESRD的高病死率,高致残率给人类健康带来巨大威胁。研究^[1]表明,受损的肾脏细胞自噬水平下降,增强自噬可以有效维持细胞内的稳定状态,抑制肾脏纤维化。同时, DN也与肾脏组织细胞G1期停滞及衰老密切相关^[2],而p16、p53、p21作为细胞衰老的标志物,它们均是调控细胞周期的关键基因^[3],参与细胞衰老的表达调节;另有文献^[4-5]显示,激活MLCK/pMLC信号通路能够调节氧化应激效应,促进ROS生成,引发细胞衰老。自噬与衰老都是细胞应激的反应,二者密切相关,机体衰老常伴随着自噬水平的降低,增强自噬可以延缓衰老的发生。

褪黑素(melatonin, MLT)是由哺乳动物分泌的一种胺类激素,它可以通过直接清除自由基来实现抗氧化活性和抗炎性。同时有研究^[6-7]表明,MLT能增强自噬,也具有强烈的抗衰老作用。该实验以DN大鼠为对象,探究在MLT参与下肾脏细胞自噬与衰老的变化,深化MLT对肾脏抗衰老作用的认识。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级SD雄性大鼠15只,体重250~300 g,购自安徽医科大学实验动物中心,12 h光照、12 h黑暗交替,温度(22±1)℃,湿度在50%~60%条件下适应性喂养。

1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、MLT均购自美国Sigma公司;尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测试盒、肌酐(CRE)测定试剂盒、Masson染液均购自南京建成生物工程研究所;Western blot检测试剂:一抗MLCK、Anti-p62抗体均购自美国Santa Cruz公司;Anti-beta Actin、Anti-p21、Anti-p16、Anti-p53、山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗小鼠IgG-HRP均购自英国Abcam公司;LC3B购自美国CST公司;BCA试剂盒、细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司。

1.3 主要仪器 -80℃超低温冰箱(日本SANYO

2021-03-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81570419); 安徽医科大学博士科研启动基金(编号: XJ201617)

作者单位: 安徽医科大学分子生物学实验室, 安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室, 安徽医科大学生物工程系, 合肥 230032

作者简介: 陈永昕, 男, 硕士研究生;

朱华庆, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydzhq@126.com;

王怡, 女, 博士, 责任作者, E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn

电器股份有限公司); 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 全自动数码凝胶成像系统(上海欧翔公司); 磁力搅拌器(北京中兴伟业仪器有限公司); pH 仪(上海雷磁仪器厂); 冰冻切片机(德国 Leica 公司); 正置生物显微镜(德国 Leica 公司)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法及实验分组 SD 大鼠经适应性喂养后, 随机分为正常组、模型组和 MLT 组, 各 5 只。模型组和 MLT 组一次性腹腔内注射剂量为 55 mg/kg 的 STZ, 正常组注射等体积的枸橼酸缓冲液。48 h 后空腹尾静脉取血, 测得血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 造模成功。MLT 组腹腔注射 MLT 10 mg/(kg · d), 正常组和模型组腹腔注射等体积生理盐水, 共饲养 16 周。

1.4.2 标本采集及处理 首先称取 SD 大鼠体质量, 采用乙醚麻醉后固定在实验板上, 找到主动脉, 取主动脉血注入装有肝素的抗凝管, 静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清后做好标记并置于 -20°C 冰箱待测。用剪刀剪开大鼠腹部, 找到肾脏组织, 剪刀剪下, 置于预冷的 PBS 缓冲溶液中漂洗 3 次, 洗去血和残余结缔组织, 滤纸除去残余水分, 一部分经液氮急速冷冻, 另一部分采用最佳切削温度化合物(optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋剂冰冻包埋后切片, 每片厚度为 5 μm , 均储存于 -80°C 冰箱中备用。

1.4.3 血肌酐和 BUN 取标记好的血清, 检测各组血肌酐(serum creatinine, SCR) 和 BUN 水平。SCR: 在 96 孔板上, 每孔分别加入 6 μl 样本、180 μl 酶溶液 A, 37°C 下孵育 5 min, 于 546 nm 波长测定吸光度值 A1, 再加入 60 μl 酶溶液 B, 再次测定吸光度值 A2, 根据说明书公式计算肌酐值; BUN: 按说明书配置好各试剂, 取 20 μl 待测样本加入 250 μl 缓冲酶液中, 混匀后 37°C 准确水浴 10 min, 然后加入酚显色剂和碱性次氯酸钠各 1 ml, 充分混匀后 37°C 水浴 10 min, 640 nm 波长下测定吸光度值, 根据公式计算 BUN 含量。

1.4.4 Masson 染色观察 从 -80°C 冰箱取肾组织冰冻切片, 按常规方法进行 Masson 染色, 光镜下观察肾组织病理学变化。

1.4.5 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal) 染色 取肾组织冰冻切片, 按说明书步骤进行 SA- β -gal 染色, 光镜下观察蓝色沉淀。

1.4.6 Western blot 检测法 取保存于冰箱中的肾脏组织, 称取 0.1 g, PBS 漂洗后, 用滤纸除去残余水

分, 用剪刀剪碎后转入研磨器中, 加入 1 ml 蛋白裂解液(含 PMSF, 1 : 1 000), 置于冰上充分研磨至匀浆, 再转至 EP 管中, 反复冻融 3 次, 4°C 离心机 14 000 r/min 离心 30 min 后取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 加蛋白裂解液调配成等体积同浓度的样本, 再加入蛋白上样缓冲液, 混匀后于沸水中煮 10 min 至变性, -80°C 保存。配置 SDS-PAGE 凝胶, 各组样本等量上样进行电泳, 电泳完成后将蛋白转至 PVDF 膜上, 转膜完成后置于摇床上, 以 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。一抗 p21(1 : 1 000)、p16(1 : 1 000)、p53(1 : 1 000)、 β -actin(1 : 1 000)、 4°C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜后二抗(1 : 5 000) 室温下孵育 2 h。TBST 洗膜, 配置显影剂进行显影。以 QuantityOne 软件分析各条带灰度值, 参照 β -actin 计算相对灰度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLT 干预后对 DN 大鼠肾脏组织 SCR、BUN 水平的影响 模型组大鼠与正常组比较, BUN、SCR 水平均有增高($P < 0.05$); MLT 治疗后, 与模型组比较, MLT 组 BUN、SCR 水平均有下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 MLT 对 DN 大鼠 BUN 及 SCR 水平影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

项 目	正常组	模型组	MLT 组	F 值
SCR($\mu\text{mol/L}$)	49.76 $\pm$ 2.85	56.43 $\pm$ 4.16	48.33 $\pm$ 3.36	7.34
BUN(mmol/L)	15.94 $\pm$ 0.10	22.26 $\pm$ 1.48	19.29 $\pm$ 1.42	33.59

2.2 Masson 染色结果 与正常组比较, 模型组 DN 大鼠肾间质纤维化明显; 经 MLT 治疗后, 胶原纤维染色阳性率显著下降。见图 1。

2.3 SA- β -gal 染色结果 与正常组比较, 模型组 DN 大鼠肾组织细胞出现明显的 SA- β -gal 染色阳性; 与模型组比较, MLT 组 SA- β -gal 染色阳性率显著下降。见图 2。

2.4 MLT 干预后对 DN 大鼠肾脏组织 p62、LC3B 蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 p62 蛋白水平升高($P < 0.05$), LC3B 蛋白水平降低($P < 0.05$); MLT 治疗后, DN 大鼠肾脏组织中 p62 蛋白表达水平下降($P < 0.05$), LC3B 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 MLT 干预后对 DN 大鼠肾脏组织 MLCK 表

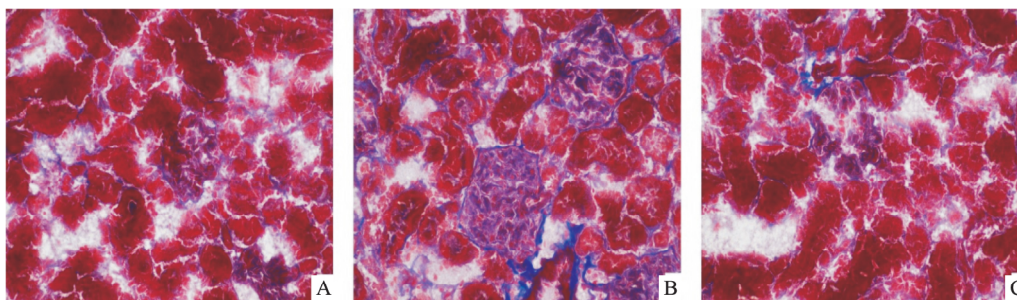


图1 各组大鼠肾组织 Masson 染色 ×200

A: 正常组; B: 模型组; C: MLT 组

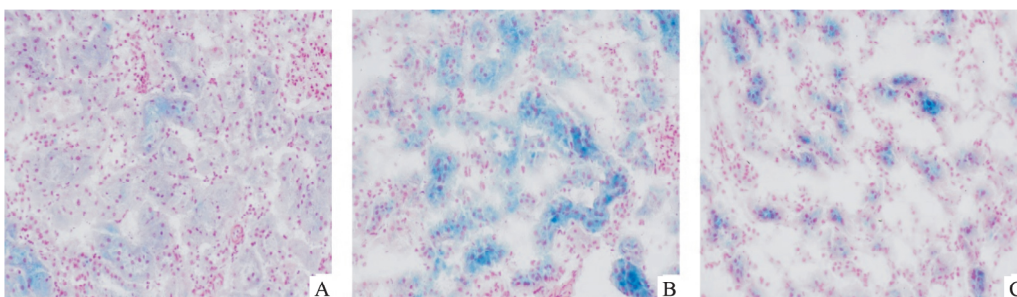


图2 各组大鼠肾组织 SA-β-gal 染色 ×200

A: 正常组; B: 模型组; C: MLT 组

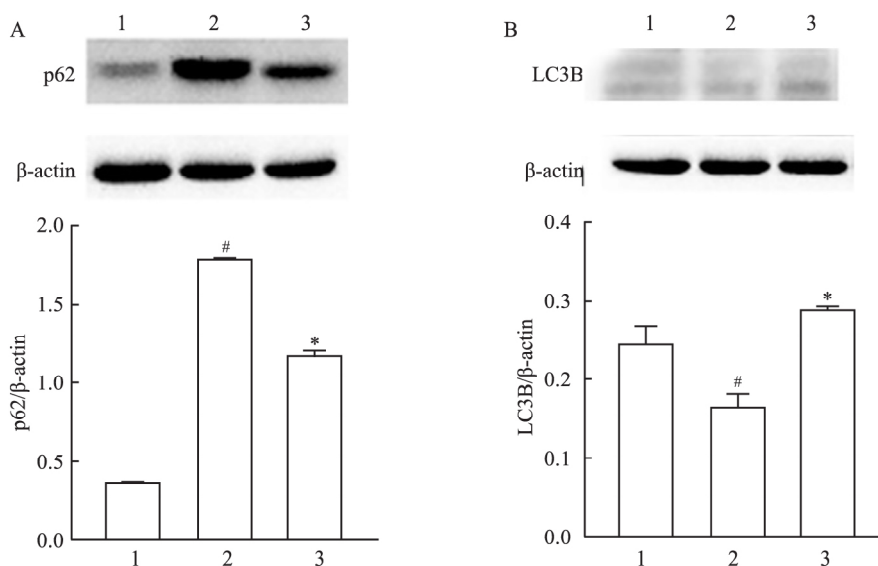


图3 Western blot 检测肾脏组织中 p62、LC3B 表达情况

A: 肾脏组织中 p62 表达水平; B: 肾脏组织中 LC3B 表达水平; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: MLT 组; 与正常组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中 MLCK 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); MLT 治疗后, DN 大鼠肾脏组织的 MLCK 表达水平下降 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.6 MLT 干预后对 DN 大鼠肾脏组织 p16、p52、

p21 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中 p16、p52、p21 蛋白表达水平均有升高 ($P < 0.05$); MLT 治疗后, DN 大鼠肾脏组织中 p16、p52、p21 蛋白表达水平均有下降 ($P < 0.05$)。见图 5。

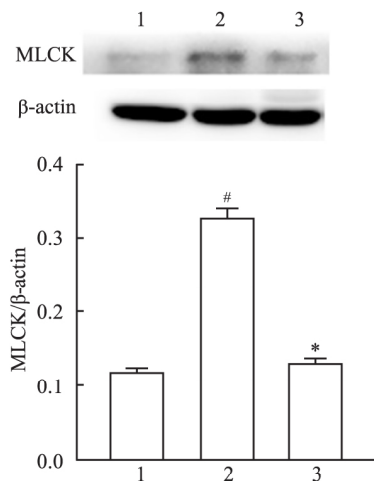


图4 Western blot 检测肾脏组织中 MLCK 表达情况

1: 正常组; 2: 模型组; 3: MLT 组; 与正常组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

DN 是造成 CKD 和 ESRD 的主要原因之一, 针对糖尿病患者的既定治疗方案包括控制血糖、胆固醇和高血压等, 但这些方案对 ESRD 及其带来的心血管风险并不能提供完全的保护。因此, 研究 DN 发病机制并寻找新的更有效的治疗方法具有重要意义。DN 是典型的细胞衰老相关性疾病^[8], 在其发展过程中涉及的机制都与衰老密切相关。研究细胞衰老在 DN 中的新兴作用, 靶向延缓或阻断衰老的治疗方法也被认为是治疗 DN 的一种很有前景的新策略^[9]。

衰老和自噬都是细胞对外界刺激因素的应激反

应, 活性氧刺激、炎症等都会引发细胞衰老、激活自噬。细胞衰老往往伴随自噬水平的降低, 恢复自噬可以延缓衰老的进展。自噬是胞内依赖溶酶体途径清除、降解未折叠或折叠错误蛋白质及受损细胞器的过程, 对维持细胞自身稳态、延续细胞生命至关重要。在溶酶体降解过程中, p62 与底物结合后被蛋白水解酶降解, LC3B 则参与自噬小体的形成, 通过自噬标记物 p62 和 LC3B 可以直接反应自噬水平的变化。细胞衰老最明显的特征是细胞分裂进入不可逆的细胞周期阻滞状态。p53-p21-RB 信号通路和 p16INK-RB 信号通路主要负责调控细胞周期, 激活这 2 条通路会导致 p53 蛋白、p21 蛋白、p16 蛋白高表达, 进而加速细胞衰老的进程^[10]。研究^[11]表明, p53 上调会加重自噬抑制, 肾纤维化与 p53 呈正相关, 与 LC3B 呈负相关。p21 则是 p53 的下游基因, 其编码的蛋白可以通过 C 端与增殖细胞核抗原 (PCNA) 结合, 使 PCNA 无法活化 DNA 聚合酶, 进而抑制 DNA 的合成; 另一方面 p21 蛋白还可以使视网膜母细胞瘤 (RB) 无法磷酸化, 阻断 RB-E2F 信号通路, 无法激活细胞分裂转录因子, 从而阻滞细胞 G1 期, 使肾脏细胞向衰老样表型发展, 同时抑制肾小管细胞的增殖^[12]。p16 则通过结合和抑制细胞周期素依赖激酶 4 和 6 (CDK4/6) 来阻止细胞增殖, 诱导细胞衰老, 而 p16 的降解和定位依赖于自噬途径^[12]。

MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 信号通路调节包括应激、炎症在内的诸多病理效应, 其中一条重要支路为细胞外信号调节激酶 (ERK), 研究^[13]表明,

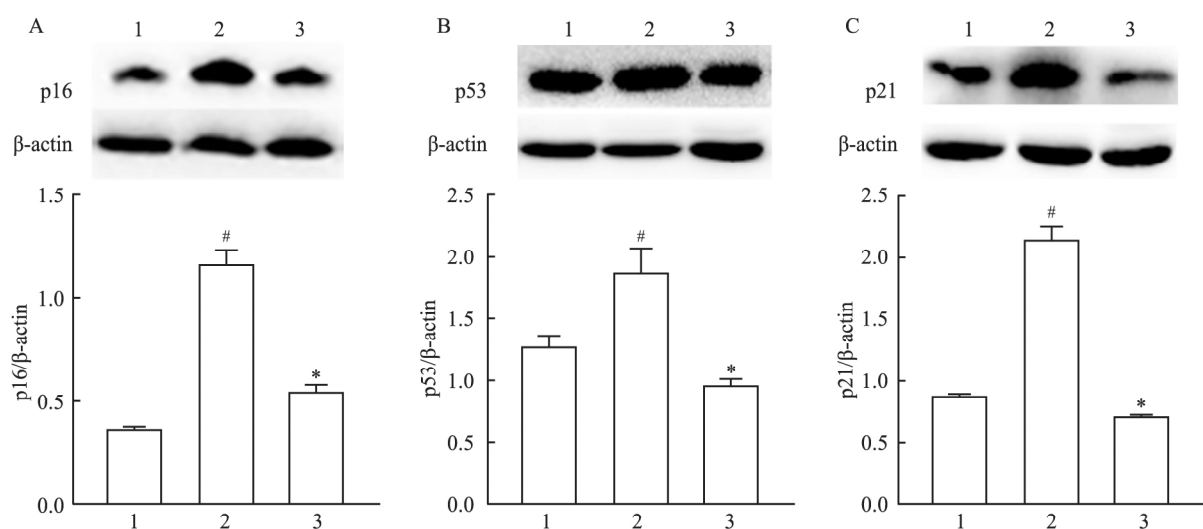


图5 Western blot 检测肾脏组织中 p16、p53、p21 表达情况

A: 肾脏组织中 p16 表达水平; B: 肾脏组织中 p53 表达水平; C: 肾脏组织中 p21 表达水平; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: MLT 组; 与正常组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

ERK 活化可以促使肌球蛋白轻链(MLC)在肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)的介导下磷酸化,带来一系列连锁反应,抑制 MLCK 可以显著降低细胞从静止状态向增殖状态转变,作为负细胞调节因子的 p16 在转变过程中核表达水平也出现显著变化。近年来,有实验^[5]表明,NADPH 氧化酶(NOX)衍生的 ROS 能促进高脂血症中循环内皮祖细胞(EPC)的衰老和功能障碍,其中 NOX 的上调和 ROS 的增加则依赖于 MLCK 信号通路的磷酸化,另有研究^[6]称 AGEs 也通过相关途径参与调节内皮细胞衰老。

MLT 是一种有较强的生物活性的内源性激素,参与生理和神经内分泌功能的昼夜节律调节,相比于化学合成药物,对机体的副作用小,能维持细胞膜的稳定,具有增强自噬、抗氧化、抗炎症、抗衰老等诸多功能^[4]。在成功构建大鼠 DN 模型并给予 MLT 干预后,该实验检测了 DN 大鼠血清中 BUN、SCR 的含量,与模型组比较,MLT 组的 BUN 和 SCR 水平均有下降,表明肾功能在 MLT 治疗后得到了改善;随后采用 Masson 染色观察了肾组织的病理变化,结果显示,MLT 有效地减缓了肾损伤。MLT 能诱导细胞增强自噬,为了研究 MLT 是否通过诱导自噬保护了肾脏细胞,该研究对自噬标志物 p62、LC3B 进行了测定。数据表明,模型组中自噬相关蛋白 LC3B 表达水平降低,p62 水平升高,自噬受到抑制。经 MLT 治疗后,LC3B 表达水平升高,p62 表达水平降低,自噬异常得到改善。该研究又采用了 β -半乳糖苷酶(衰老标志物之一)染色法检测了肾脏细胞,结果表明 MLT 组细胞衰老情况有明显的改善。既往实验^[15-16]表明,MLT 在动脉粥样硬化等心血管疾病中能通过 p38/MAPK 信号通路下调 MLCK 表达保护心肌细胞;在骨质疏松症中,能通过降低 p16 表达延缓衰老。该实验采用 Western blot 法检测了 MLCK 和 p16,结果显示 MLT 组 MLCK、p16 较模型组有所下降。MLT 可能通过抗衰老保护了 DN 大鼠肾脏组织,该实验又进一步检测了肾脏组织中的细胞衰老标志物 p53 和 p21。与正常组比较,模型组中 p53、p21 表达水平均有升高;经 MLT 治疗后,p53、p21 表达水平显著下降。因此,推测 MLT 在肾脏组织中可能通过增强自噬、延缓衰老保护 DN 肾脏。然而,自噬与 DN 发病机制的关系仍然需要探究,p53、p21、p16 也受多种信号因子调控,未来有必要进一步研究 MLT 在保护肾脏细胞过程中的具体作用,这对治疗 DN 寻找可能的靶点有着重要的意义。

参考文献

- [1] 吴明昊,胡桂才,高宇. 自噬与糖尿病肾脏疾病固有细胞关系的研究进展 [J]. 实用医学杂志,2017,33(5):837-9.
- [2] Jiang X, Ruan X L, Xue Y X, et al. Metformin reduces the senescence of renal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy via the MBNL1/miR-430a-3p/STAT3 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8708236.
- [3] Ye G, Xie Z, Zeng H, et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction facilitates mesenchymal stem cell senescence in ankylosing spondylitis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 775.
- [4] 程冕,严金华,阮磊,等. 晚期糖基化终末产物对内皮细胞衰老及内皮屏障功能的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2019, 2019(4): 362-6.
- [5] Li T B, Zhang J J, Liu B, et al. Involvement of NADPH oxidases and non-muscle myosin light chain in senescence of endothelial progenitor cells in hyperlipidemia [J]. N-S Arch Pharmacol, 2016, 389(3): 289-302.
- [6] Xu F, Zhong J Y, Lin X, et al. Melatonin alleviates vascular calcification and ageing through exosomal miR-204/miR-211 cluster in a paracrine manner [J]. J Pineal Res, 2020, 68(3): e12631.
- [7] 徐玉生,汪鑫,理阳,等. 褪黑素对大鼠急性脊髓损伤后自噬的影响 [J]. 医药论坛杂志, 2017, 38(5): 76-8.
- [8] Zhou B, Wan Y, Chen R, et al. The emerging role of cellular senescence in renal diseases [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(3): 2087-97.
- [9] Childs B G, Gluscevic M, Baker D J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(10): 718-35.
- [10] Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(7): 482-96.
- [11] Ma Z, Li L, Livingston M J, et al. p53/microRNA-214/ULK1 axis impairs renal tubular autophagy in diabetic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2020, 130(9): 5011-26.
- [12] Coryell P R, Goraya S K, Griffin K A, et al. Autophagy regulates the localization and degradation of p16INK4a [J]. Aging Cell, 2020, 19(7): e13171.
- [13] 谭佳成. ERK-MLCK 通路介导褪黑素对食管上皮紧密连接作用的机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [14] Lee F Y, Sun C K, Sung P H, et al. Daily melatonin protects the endothelial lineage and functional integrity against the aging process, oxidative stress, and toxic environment and restores blood flow in critical limb ischemia area in mice [J]. J Pineal Res, 2018, 65(2): e12489.
- [15] 余沛,王雪,王怡,等. 褪黑素对实验性动脉粥样硬化兔心脏的保护作用及其可能的分子机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(12): 1747-51.
- [16] 陈曦. 褪黑素在骨质疏松症治疗中的作用及其分子机制的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.

(下转第 1041 页)

lung adenocarcinoma A549 cells through NIX-mediated mitochondrial autophagy. **Methods** A549 cells were exposed to various concentrations of MitoQ for 12 hours, the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to detect cell viability. Cell migration was measured with scratch assay. Western blot analysis was used to detect the expression levels of the mitochondrial autophagy and apoptosis related proteins NIX, p62 and Bax. **Results** Compared with that in the control group, MitoQ groups showed significant inhibition of proliferation and migrate. Accompanied by the occurrence of apoptosis, the expression of autophagy-promoting related proteins (NIX) was up-regulated, the expression of autophagy-inhibiting related proteins (p62) was down-regulated, the expression of apoptosis-promoting related proteins (Bax) was up-regulated, and the difference increased with elevating MitoQ concentration ($P < 0.05$); compared to the control group, MitoQ groups exhibited a decreased capacity for cell migrate and proliferation, and an increased levels of mitochondrial autophagy and apoptosis. **Conclusion** MitoQ can inhibit A549 cells migration and proliferation, and promote A549 cells apoptosis. The mechanism may be related to the MitoQ regulating key molecules on the mitochondrial autophagy pathway and inducing autophagy in A549 cells, and the key molecule of mitochondrial autophagy may be the NIX protein.

Key words MitoQ; NIX; A549; autophagy; apoptosis

(上接第 1036 页)

Study on the mechanism of melatonin to delay the aging of kidney cells in diabetic rats

Chen Yongxin, Liu Wanqing, Zhou Qing, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effect of melatonin (MLT) on diabetic nephropathy (DN) rats, and to explore the mechanism of MLT delaying the progression of DN in rats. **Methods** Fifteen male SD rats were randomly divided into the normal group, model group and MLT group with 5 rats in each group. Rats in the model group and the MLT group were given 55 mg/kg of streptozotocin (STZ) by intraperitoneal injection in order to establish a DN rat model. After the model was successfully established, rats in the MLT group were given 10 mg/(kg · d) of MLT by intraperitoneal injection, and rats in the normal group and model group were given the equal volume of normal saline. Abdominal aortic blood and kidney tissue of rats were taken 16 weeks after they were given, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCR) in serum were detected; masson staining was used to observe morphological changes of kidney tissue; β -galactosidase staining (β -gal) was used to detect changes in kidney cell aging; Western blot was used to detect the expression levels of autophagy markers (p62, LC3B), myosin light chain kinase (MLCK) and cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors (p16, p53, and p21). **Results** Compared with the normal group, the levels of BUN and SCR in serum in the model group increased, renal interstitial fibrosis was obvious, the autophagy level of kidney tissue decreased, and the expression levels of MLCK, p16, p53, and p21 increased. Compared with the model group, the levels of BUN and SCR in serum in the MLT group decreased, and the aging of the kidney tissue was delayed. After MLT was administered, the pathological damage was significantly reduced, and the autophagy level of kidney tissue was also improved. The expression levels of MLCK, p16, p53 and p21 decreased. **Conclusion** MLT can improve the progress of DN in DN rats by increasing autophagy and delaying aging.

Key words diabetic nephropathy; autophagy; melatonin; p16; p53; MLCK