论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0160-03

肝细胞色素氧化酶Ⅰ在非酒精性脂肪肝大鼠形成中的作用

史洪涛,李 陶,陈东风 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究肝脏线粒体DNA细胞色素氧化酶Ⅰ(COXⅠ)在非酒精性脂肪肝大鼠的表达及其意义。**方法** Wistar大鼠40只,随机分为正常对照组和高脂饲料2、4、8、12周组(其中每组各8只);紫外分光光度法测定肝脏细胞色素氧化酶活性,Western blot方法研究高脂饲料诱导的大鼠脂肪肝形成中肝细胞COXⅠ蛋白的表达变化,逆转录聚合酶链反应测定肝细胞COXⅠ mRNA表达变化。**结果** 脂肪肝2、4、8和12周细胞色素氧化速率分别为(0.88±0.32)、(0.76±0.37)、(0.48±0.26)、(0.39±0.21)/min,与正常对照组(0.98±0.37)/min较明显降低($P<0.01$),肝细胞COXⅠ基因及蛋白表达随着脂肪肝程度的加重亦明显增强。**结论** 非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素C氧化酶活性下降以及线粒体编码呼吸链相关的细胞色素C氧化酶COXⅠ基因和蛋白质降低,与脂肪肝引起的肝脏损害密切相关。

关键词: 非酒精性脂肪肝;细胞色素氧化酶;逆转录聚合酶链反应

中图法分类号: R345.4;R394.2;R575.502 **文献标识码:** A

Effect of hepatocyte cytochrome oxidase Ⅰ on nonalcoholic fatty liver in rats

SHI Hong-tao, LI Tao, CHEN Dong-feng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the expression and effect of hepatocyte mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunits Ⅰ (COXⅠ) gene in rat nonalcoholic fatty liver model. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into control group and high-fat diet group, and the high-fat diet group was subsequently divided into 4 subgroups (2, 4, 8 and 12 week) with 8 rats in each. Cytochrome c oxidase activity was determined by ultraviolet spectrophotometer. Meanwhile, the expression of hepatocyte COXⅠ antigen in rat nonalcoholic steatosis model induced by high fat diet were detected by Western blotting. Mitochondrial DNA COXⅠ mRNA were assayed by reversetranscription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The levels of activity in nonalcoholic steatosis rats induced by high fat diet at 2, 4, 8, and 12 weeks were (0.88±0.32), (0.76±0.37), (0.48±0.26), (0.39±0.21) nmol·mg^{-1}·min^{-1}, respectively, significantly lower than (0.98±0.37) nmol·mg^{-1}·min^{-1} in control group ($P<0.01$). The expression of hepatocyte COXⅠ gene and COXⅠ mRNA in rat nonalcoholic steatosis model induced by high fat diet was correspondingly enhanced with the exacerbation of fatty liver and markedly higher than that of controls. **Conclusion** The low cytochrome c oxidase activity and the expression of hepatocyte COXⅠ gene and protein in nonalcoholic steatosis rats are closely associated with liver damage induced by nonalcoholic fatty liver.

Key words: nonalcoholic fatty liver; cytochrome c oxidases; reverse transcription polymerase chain reaction

非酒精性脂肪肝的发病率逐年上升,并可能导致肝硬化和肝癌。线粒体是能量转变的细胞器,其主要作用是编码与线粒体呼吸链相关的蛋白亚单位,其中细胞色素C氧化酶是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,是线粒体氧化能力的关键调节部位[1]。为此,我们通过高脂饲料诱发大鼠脂肪肝模型动态观测肝脏线粒体DNA细胞色素C氧化酶基因COXⅠ及蛋白表达变化,为脂肪肝的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗鼠COXⅠ抗体购自Molecular Probes公司,Western blotting、RT-PCR相关试剂购自上海生物化学公司。酶抑制剂complete mini购自罗氏公司。丙二醛(MDA)试剂盒购自南京市建成生物化学公司。

1.2 实验动物

雄性Wistar大鼠40只,体质量150~220 g(第三军医大学

作者简介:史洪涛(1967-),男,辽宁省辽阳市人,博士,主治医师,主要从事胃肠动力学和脂肪肝方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757342

收稿日期:2005-03-20;修回日期:2005-05-17

实验动物中心提供)。大鼠正常喂养1周后,根据随机量表分为两组,正常对照组8只,高脂饮食组32只(给予基础饲料88%,猪油10%,胆固醇1.5%,胆盐0.5%及可口的添加剂),实验动物自由饮水进食,对照组大鼠于8周处死,高脂饮食组各8只分别于2、4、8、12周后处死,取肝活组织于-70 ℃低温冰箱保存和石蜡切片待检。

1.3　病理学检查

取肝右叶,石蜡切片,常规HE染色,观察脂肪肝程度。

1.4　紫外分光光度法细胞色素C氧化酶活性的测定[2]

取肝脏组织100 mg,匀浆,然后取0.18 mmol/L细胞色素C 0.5 ml,加入磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)和$Na_2S_2O_4$摇匀,用紫外分光光度计在550 nm波长下测得D(550)值,然后加入肝脏组织匀浆液0.1 ml,立即开始计时,然后每隔1分钟测定1次D(550)值,持续测定5 min,最后加入饱和高铁氰化钾1滴,使之完全氧化并记录结果。以最小二乘法计算,并经原点线求其斜率(K)值,即为细胞色素C氧化速率常数,代表细胞色素C氧化酶的活力。

1.5　肝组织丙二醛(MDA)含量测定

按照丙二醛(MDA)测定试剂盒说明书进行。

1.6　Western blot分析COXⅠ蛋白表达

取右肝组织200 mg加入含蛋白酶抑制剂complete mini的PBS缓冲液,4 ℃匀浆后10 000×g离心15 min,上清蛋白定量后,取50 μg蛋白,变性,行聚丙酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维膜,6%脱脂奶粉室温封闭1 h,4 ℃过夜,洗涤后膜和兔抗鼠Ⅰ抗体(1∶500)作用,4 ℃过夜,洗涤后加入辣根过氧化酶结合的抗兔IgG(1∶4 000),化学发光试剂检测,X线片显影。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各条目的带积分灰度值,所测结果为扣除背景的积分光密度(D值)。

1.7　RT-PCR反应

肝脏总RNA提取和cDNA合成分别用Tripure试剂盒和Thermoscript RT-PCR试剂盒(Gibco BRL,Gaithersburg, MD),按试剂盒标准步骤操作。

PCR引物序列:COXⅠ:5′-GGGAGAAGCCTTAGTAGAG-GAGATTCTC-3′,5′-CGGGTGTCTACATCTAGGCCTACTGT-3′;内对照β-actin:5′-AAATCGTCGG TGACA TCAAA-3′,5′-ATCG-TACTCGTGCTTGCTGA-3′。PCR反应体系:cDNA 3 μl,10 mmol/L dNTP 2.5 μl,25 mmol/L Mg^{2+} 5 μl,10×PCR缓冲液5 μl,DEPC H_2O 31 μl,*Taq*酶0.5 μl,COXⅠ、β-actin引物各1.5 μl。95 ℃预变性220 s,95 ℃变性40 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸70 s,循环30次,72 ℃延伸10 min终止反应。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,凝胶图像分析系统对RT-PCR产物电泳条带进行密度分析。

1.8　统计学处理

实验结果用$\bar{x} \pm s$表示,采用Student's t检验。

2　结果

2.1　肝组织病理学变化

光镜下HE染色显示,对照组大鼠肝组织的形态学表现正常,高脂饮食组2、4、8、12周所有动物肝组织出现不同程度的肝细胞脂肪变性,肝细胞变大,细胞质内可见大泡样脂滴,脂肪肝程度与高脂饮食时间相关,2、4周为轻-中度,8、12周为中-重度。

2.2　细胞色素氧化酶活性测定

结果显示,高脂饮食组2、4、8、12周细胞色素氧化速率分别为(0.88±0.32)、(0.76±0.37)、(0.48±0.26)、(0.39±0.21)/min,与正常对照组(0.98±0.37)/min比较明显降低($P<0.01$)。

2.3　肝脏MDA含量变化

正常对照组大鼠肝脏MDA含量(3.12±0.31)nmol/mg-prot,高脂饮食组2周(3.53±0.35)、4周(4.47±0.43)、8周(4.85±0.46)、12周(5.28±0.53),随着高脂饮食时间的延长,脂肪肝程度的加深,MDA活性增强,与对照组比较相差显著($P<0.05$)。

2.4　Western blot免疫印迹分析法检测COXⅠ蛋白表达

结果显示,正常对照组D值(866.3±40.1),高脂饮食2周(788.1±42.5)、4周(716.4±36.1)、8周(605.1±38.1)、12周(492.8±35.6)。高脂饮食组与正常对照组相比明显下降,随脂肪肝程度的加重,逐渐降低($P<0.05$, $P<0.01$)(图1)。

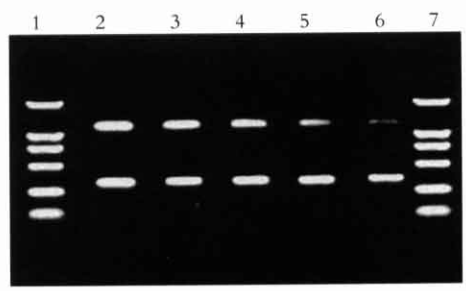


1:正常对照组;2、3、4、5分别为高脂饮食诱导脂肪肝大鼠2、4、8、12周组

图1　脂肪肝大鼠肝脏COX Ⅰ蛋白表达

2.5　脂肪肝大鼠COXⅠ mRNA变化

RT-PCR结果显示,正常对照组D值(2.986±0.187),高脂饮食2周(2.642±0.198)、4周(2.125±0.212)、8周(1.768±0.216),12周(1.626±0.148)。高脂饮食组与正常对照组相比明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),随脂肪肝程度的加重,逐渐降低(图2)。



1,7:标准;2:正常对照组;3、4、5、6分别为高脂饮食诱导脂肪肝大鼠2、4、8、12周组

图2　脂肪肝大鼠肝脏COX Ⅰ mRNA表达

3 讨论

随着人民生活水平的提高,饮食结构的变化,非酒精性脂肪肝在我国发病率正在迅速上升,且能够演变为肝纤维化和肝硬化,严重危及着人们的健康[3]。对于NAFL发病机制的研究目前主要集中在脂质代谢异常、氧应激及脂质过氧化损伤、遗传因素的作用、胰岛素抵抗等方面,但迄今为止NAFL的发病机制仍不明确[4,5]。线粒体是一种结构和功能复杂而敏感多变的细胞器,线粒体本身有其自身的遗传物质-mtDNA,缺乏组蛋白保护,损伤修复系统不健全,易遭受氧化物等损伤因子的攻击而发生突变,成为脂肪肝发生的靶点。mtDNA的主要作用是编码与线粒体呼吸链相关的蛋白亚单位,细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)是线粒体内呼吸链电子传递的终末复合物,是电子传递链的限速酶,是线粒体氧化能力的关键调节部位,它位于呼吸链的末端,催化以细胞色素C和氧为底物的氧化还原反应,该反应与质子跨线粒体内膜的运输相耦联,产生的质子电化学梯度驱动生物的"能量通货"——ATP的合成,被称为需氧生命的能量发生器[1]。

COX与线粒体功能及细胞能量的产生密切相关,其编码基因的改变、表达及酶活性的发挥对细胞在生理和病理情况下的机能、代谢和形态结构有直接影响。在真核细胞中,该酶作为一种跨膜整合蛋白存在于线粒体内膜上(即不对称地横跨在膜上),已知COX有6~13个亚基,所有哺乳动物真核细胞的由13个亚基组成,其中最大的3个亚基(COXⅠ、Ⅱ和Ⅲ)来源于线粒体。COX活性的调节涉及到编码蛋白的表达,如在衰老过程中慢性缺血缺氧使人脑组织中的蛋白水平明显下降的同时,活性也显著降低[6,7]。

本研究对肝组织丙二醛(MDA)含量的检测发现在非酒精性脂肪肝大鼠肝脏MDA含量较对照组明显增加,且脂肪变越重、炎性反应越多的肝脏组织MDA的含量越多,提示MDA与脂肪变的程度及炎症反应的发生密切相关,而线粒体是反应性氧(ROS)形成的主要部位,也是ROS打击的首要靶子[8]。ROS造成肝损伤的重要机制是通过脂质过氧化反应引起,而MDA是脂质过氧化物中最具代表性的一种。在非酒精性脂肪肝时,随着其程度的加重,肝细胞结构和功能的损害,脂质过氧化反应逐渐加剧,导致氧应激,使反应性氧增多,通过链式反应,放大活性氧的作用,导致线粒体膜损伤,膜流动性下降,通过活化IKKβ途径引起脂肪肝的发生,导致肝损害[9,10]。本研究结果表明非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素C氧化酶活性下降,Western blot免疫印迹检测脂肪肝大鼠COXⅠ蛋白表达与正常对照组相比明显下降,且随脂肪肝程度的加重,表达逐渐降低。证明线粒体功能障碍引起ROS生成增加是导致脂肪变加重以及向脂肪性肝炎转化的重要环节,进一步印证了"二次打击学说"。

PT-PCR检查非酒精性脂肪肝大鼠COXⅠ基因下降,且与脂肪肝引起的肝脏损害密切相关。提示活性与COXⅠ翻译水平的下降有关。非酒精性脂肪肝大鼠细胞色素C氧化酶活性的降低、细胞色素C氧化酶亚单位 蛋白和基因水平的降低,可导致线粒体能量生成障碍,ATP生成不足,影响肝细胞正常运行,可能为非酒精性脂肪肝发生的一个重要原因。

非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞COXⅠ表达变化与脂肪肝引起的脂质过氧化反应以及肝脏损害程度密切相关,肝细胞COXⅠ可能参与了非酒精性脂肪肝的发生。

参考文献:

[1] GENNIS R, FERGUSON MILLER S. Structure of cytochrome c oxidase, energy generator of aerobic life[J]. Science, 1995, 269(5227): 1063-1064.

[2] 张广兰, 王泽华, 林美华. 线粒体$tRNA^{leu(UUR)}$基因突变和细胞色素C氧化酶活性降低在妊高征发病中的作用[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(7): 403-405.

[3] 冯爱娟, 王 军, 陈东风. FATP4在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(19): 1726-1728.

[4] SELZNER N, SELZNER M, JOCHUM W, *et al*. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism[J]. J Hepatol, 2003, 39(1): 55-61.

[5] SOLGA S F, DIEHL A M. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics[J]. J Hepatol, 2003, 38(5): 681-687.

[6] CHINENOV Y V. Cytochrome c oxidase assembly factors with a thioredoxin fold are conserved among prokaryotes and eukaryotes[J]. J Mol Med, 2000, 78(5): 239-242.

[7] TSUKIHARA T, AOYAMA H, YAMASHITA E, *et al*. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8[J]? Science, 1996, 272(5265): 1136-1144.

[8] GENOVA M L, PICH M M, BERNACCHIA A, *et al*. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1011: 86-100.

[9] YANG S, ZHU H, LI Y, *et al*. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 378(2): 259-268.

[10] FELDSTEIN A E, CANBAY A, GUICCIARDI M E, *et al*. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2003, 39(6): 978-983.

(编辑 薛国文)