# 老年、高龄及长寿老人肝脾组织基因组 DNA 含量的变化及比较

胡亚卓[1],夏 征[1],韩志涛[1],张红红[1],王建华[1],耿 淼[1],孟秀梅[2] (1. 解放军总医院老年医学研究所病理生理室,衰老及相关疾病研究北京市重点实验室,北京 100853;2. 山东青岛 94362 部队卫生队,山东 青岛 266111)

[摘 要] **目的** 观察尸检老年、高龄及长寿老人肝、脾组织基因组 DNA 含量的变化及差异,探讨衰老进程中 DNA 含量的变化规律并为今后的衰老相关研究提供实验数据。**方法** 选取 24 h 内老年尸检(≥65 岁)低温(-80 ℃)保存的肝组织 35 例和脾组织 33 例,按照年龄分为 3 组:65~79 岁组、80~89 岁组、≥90 岁组(其中包括百岁老人 2 例);低温(-80 ℃)保存的肝、脾组织用试剂盒提取基因组 DNA,紫外光谱法测定肝脾组织 DNA 含量,并进行比较分析。**结果** 肝组织 DNA 含量:与 65~79 岁组(1.464±0.488)mg/mL 比较,80~89 岁组(0.310±0.286)mg/mL 显著降低($P<0.05$);且≥90 岁组(1.147±0.333)mg/mL 的 DNA 含量显著高于 80~89 岁组($P<0.05$)。脾组织基因组 DNA 含量:与 65~79 岁组(1.723±0.726)mg/mL 比较,80~89 岁组(0.938±0.589)mg/mL 显著降低($P<0.05$);且≥90 岁组(1.688±0.963)mg/mL 的 DNA 含量显著高于 80~89 岁组($P<0.05$)。同一尸检者肝、脾组织 DNA 含量比较:肝组织平均 DNA 含量(0.856±0.658)mg/mL 显著低于脾组织平均 DNA 含量(1.414±0.852)mg/mL($P<0.05$)。**结论** 老年人肝、脾组织基因组 DNA 含量随增龄而降低;90 岁以上肝、脾组织 DNA 的含量均有所增加;同一尸检者肝组织 DNA 含量显著低于脾组织 DNA 含量,提示不同脏器组织 DNA 含量存在差异。

[关键词] 老年;肝;脾;基因组 DNA;尸检
[中图分类号] R394.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0175-04

## Comparison of genomic DNA content of liver and spleen tissue for different age of elderly

HU Ya-zhuo[1], XIA Zheng[1], HAN Zhi-tao[1], ZHANG Hong-hong[1], WANG jian-hua[1], GENG Miao[1], MENG Xiu-mei[2] (1. Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Key Laborarory of Normal Aging and Geriatrics, Beijing 100853; 2. Sanitary Corps in 94362 Troops of PLA, Qingdao Shandong 266111, China)

**Abstract: Objective** To investigate the change of genomic DNA of liver and spleen tissue for different age of the elderly, and provide the experimental data for aging-related research. **Methods** 35 livers and 33 spleens of autopsied samples preserved in refrigerator at -80 ℃ were divided into 3 groups according to age: age 65y to 79y, age 80y to 89y, age≥90y. The content of DNA in liver and spleen was determined by ultraviolet absorbent method. **Results** Compaired with age 80y to 89y (0.310±0.286) mg/mL, the content of DNA in liver was significant higher at age 65y to 79y (1.464±0.488) mg/mL and age ≥ 90y (1.147±0.333) mg/mL ($P<0.05$); Compared with age 80y to 89y (0.938±0.589) mg/mL, the content of DNA in spleen was significant higher at age 65y to 79y (1.723±0.726) mg/mL and age ≥90y (1.688±0.963) mg/mL ($P<0.05$). The content of DNA was significant lower in liver (0.856±0.658) mg/mL than that in spleen

doi:10.11659/jjssx.11E014002
[基金项目] 北京市自然科学基金(7122170)
[通讯作者] 张红红,E-mail:zhanghh301@sina.com
[收稿日期] 2014-11-03 [修回日期] 2014-12-05

[5] Azoulay E, Citerio G, Bakker J, et al. Year in review in Intensive Care Medicine 2013: II. Sedation, invasive and noninvasive ventilation, airways, ARDS, ECMO, family satisfaction, end-of-life care, organ donation, informed consent, safety, hematological issues in critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2014, 40(3): 305-319.
[6] Stulak JM, Dearani JA, Burkhart HM, et al. ECMO cannulation controversies and complications[J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 13(3): 176-182.
[7] Bilen O, Loftis L, Teruya J. Severe thrombotic and bleeding complications in a baby with heterozygous factor V Leiden and acquired von Willebrand disease on ECMO[J]. J Extra Corpor Technol, 2011, 43(2): 64-69.
[8] Oliver WC. Anticoagulation and coagulation management for ECMO[J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 13(3): 154-175.
[9] 陈显春,杨 英. 颈内静脉穿刺插管后持续渗血 2 例报道[J]. 局解手术学杂志, 2010, 19(6): 511.
[10] 杨正文,罗积慎,李木惠. 19 例烧伤患者创面静脉切开置管体会[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(5): 296.
[11] 徐广良,蒋玉柱,安 志,等. 动脉切开取栓后置管溶栓临床治疗分析[J]. 中国医药科学, 2011, 1(22): 175-176
[12] Lim T, Ryu HG, Jung CW, et al. Effect of the bevel direction of puncture needle on success rate and complications during internal jugular vein catheterization[J]. Crit Care Med, 2012, 40(2): 491-494.

(编辑:左艳芳)

(1.414 ± 0.852) mg/mL. **Conclusion** The content of DNA in human liver and spleen tissue may be decrease along with aging. The content of DNA in the group at age ≥90y may be increase. There were some differences between different viscera tissue in content of DNA.

**Keywords**: elderly; liver; spleen; genomic DNA; autopsy

遗传物质在遗传、变异、代谢、调控等方面起着重要作用,是人类衰老相关疾病研究的对象。随着年龄的增长,机体各器官组织逐渐发生退行性变化,感染疾病、癌症的发病率和病死率相应增高。而肝和脾作为机体重要的代谢和免疫器官,其功能随增龄而变化,很大程度上影响生存。因此,我们通过对尸检的不同年龄老年人的肝和脾组织基因组 DNA 含量研究,以期从分子水平来分析器官衰老的机制。现报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选取解放军总医院老年医学研究所老年组织库 2007 年至 2010 年的 42 例老年尸检者(≥65 岁)正常肝、脾脏组织,其中肝组织 35 例和脾组织 33 例,组织标本是严格控制在死亡 24 h 内取材并在 -80 ℃条件下保存。尸检捐献者均有知情同意书。组织标本排除了可能影响 DNA 的相关疾病及死因(癌症、血液病及遗传性疾病等),尽可能减小由于疾病及不同死因可能所致的对细胞核 DNA 降解的影响[1]。根据老年期阶段划分的标准分为 3 组:65 ~ 79 岁组(老年期)14 例,80 ~ 89 岁组(高龄老年期)16 例,≥90 岁以上组(长寿老年期)12 例(包括 2 例百岁老人)。尸检者一般临床特点(表 1)。

### 1.2 方法

1.2.1 组织基因组 DNA 的提取 为避免试验中操作的误差,每次随机选取不同组样本,尽量避开有血管及被膜的部位,称取组织约 100 mg 放入 -80 ℃冰箱(日本三洋公司 MDF-U52V)保存,置于 1.5 mL 的离心管内,加入 180 μl 的 Buffer ATL(QIAGEN 公司),微量电动匀浆器充分匀浆,40 μl 的 Proteinase K,56 ℃消化 48 h,90 ℃高温蛋白变性 1 h,依次加入 RNase、Buffer AL、100% 乙醇、Buffer AW1、Buffer AW2,每次 7 000 × *g*,2 min常温离心过离心柱,最后 Buffer ATE 溶解 DNA 于自备离心管内,-20 ℃保存。

**表 1 尸检者一般临床特点**

| 组别 | *n* | 性别(男性/女性) | 年龄(岁) | 高血压(%) | 冠心病[例(%)] | 糖尿病[例(%)] | 脑血管病[例(%)] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 65 ~ 79 岁 | 14 | 10/4 | 68.8 ± 8.6 | 6(42.9) | 5(35.7) | 3(21.4) | 4(28.6) |
| 80 ~ 89 岁 | 16 | 14/2 | 85.3 ± 2.1 | 13(81.3) | 12(75.0) | 6(27.3) | 7(43.7) |
| ≥90 岁 | 12 | 10/2 | 93.3 ± 4.1 | 10(83.3) | 12(100.0) | 5(41.7) | 5(41.7) |

1.2.2 紫外光谱法分析基因组 DNA 浓度 用紫外分光光度计(日本岛津公司 UV-2550),微量比色杯(100 μl)比色,测定 DNA 浓度、OD260、OD280 及 DNA 光谱图。DNA 的 OD260 和 OD280 的比值,可以反应提取 DNA 的品质,一般在 1.7 ~ 1.9 之间表明得到的是较为理想的结果,光谱图直观地显示出结果的真实性和可靠性。DNA 样本均取 3 μl 原液,加 87 μl 双蒸水稀释,上机检测。

1.2.3 基因组 DNA 片段检测 2% 琼脂糖凝胶电泳(电泳仪为北京六一公司产品),DNA 原液上样量 7 μl(约 200 μg),Marker 5 μl(Takara 公司 DL2 000),1 × TAE(pH = 8.0)溶解琼脂糖(sigma 公司),100 V 快速进胶后,60 V 恒压走胶,约 30 min,紫外凝胶成像系统照相(上海天能公司生产的 GIS-1000)。

1.2.4 PCR 检测 DNA 质量 引物 VDR-Fok I 分别为:5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3'和 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3'(上海生工生物有限公司),PCR 反应体系试剂盒(天根生物有限公司 KT205),2% 的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.3 统计学处理

SPSS19.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组计量资料比较采用 *t* 检验;多组计量资料比较采用方差分析。$P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 紫外光谱法测定

2.1.1 基因组 DNA 检测值 肝组织结果显示:80 ~ 89 岁组基因组 DNA 浓度(0.310 ± 0.286) mg/mL,与 66 ~ 79 岁组(1.464 ± 0.488) mg/mL、≥90 岁组(1.147 ± 0.333) mg/mL 比较,显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 66 ~ 79 岁组与≥90 岁组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。脾脏结果显示:80 ~ 89 岁组基因组 DNA 浓度(0.938 ± 0.589) mg/mL,与 66 ~ 79 岁组(1.723 ± 0.726) mg/mL、≥90 岁组(1.688 ± 0.963) mg/mL 比较,显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 66 ~ 79 岁组与≥90 岁组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。虽然肝脾基因组 DNA 浓度在 66 ~ 79 岁组及≥90 岁组比较差异无统计学意义,但能看出数值存在随龄变小的趋势。

**表 2 不同年龄组肝组织基因组 DNA 含量($\bar{x} \pm s$, mg/mL)**

| 组别 | *n* | OD260 | OD280 | DNA 浓度 | OD260/OD280 |
|---|---|---|---|---|---|
| 65 ~ 79 岁 | 12 | 1.125 ± 0.351 | 0.602 ± 0.180 | 1.464 ± 0.488 * | 1.858 ± 0.076 |
| 80 ~ 89 岁 | 11 | 0.247 ± 0.207 | 0.162 ± 0.100 | 0.310 ± 0.286 | 1.399 ± 0.258 |
| ≥90 岁 | 12 | 0.879 ± 0.239 | 0.479 ± 0.118 | 1.147 ± 0.333 * | 1.795 ± 0.159 |

*:与 80 ~ 89 岁组比较,$P < 0.05$

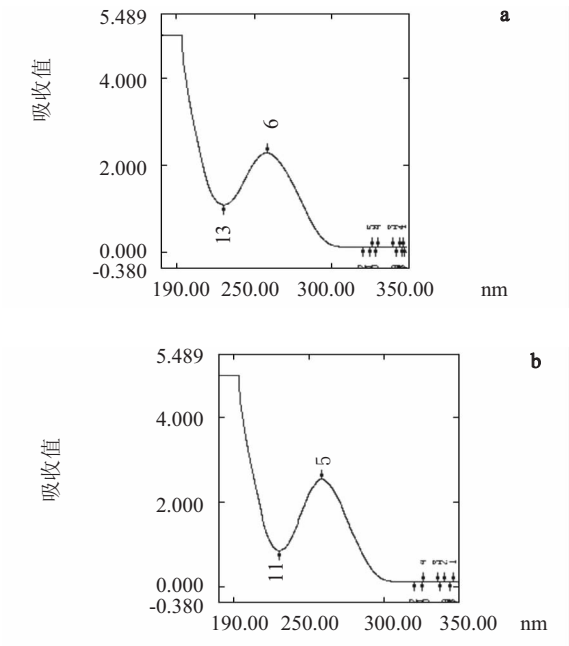
**表 3 不同年龄组脾组织基因组 DNA 含量($\bar{x} \pm s$, mg/mL)**

| 组别 | $n$ | OD260 | OD280 | DNA 浓度 | OD260/OD280 |
|---|---|---|---|---|---|
| 65 ~ 79 岁 | 7 | 1.064 ± 0.527 | 0.510 ± 0.239 | 1.723 ± 0.726 * | 2.059 ± 0.147 |
| 80 ~ 89 岁 | 14 | 0.709 ± 0.435 | 0.360 ± 0.224 | 0.938 ± 0.589 | 2.028 ± 0.309 |
| ≥90 岁 | 12 | 1.287 ± 0.742 | 0.661 ± 0.400 | 1.688 ± 0.963 * | 1.973 ± 0.167 |

*：与 80 ~ 89 岁组比较，$P < 0.05$

## 2.2 组织基因组 DNA 品质检测

选取尸检者脾和肝的基因组 DNA 样本，进行光谱测定。光谱图横坐标为波长(nm)，纵坐标为 OD 值(mg/mL)，图 1a、b均显示出在 260 nm 处有最大吸收值。

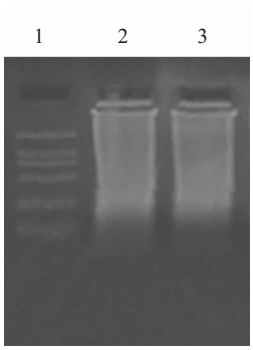



a：肝组织紫外吸收光谱；b：脾组织紫外吸收光谱

**图 1 组织紫外吸收基因组 DNA 光谱**

## 2.3 组织基因组 DNA 片段检测及 DNA 质量检测

观察基因组 DNA 片段的情况，经 2% 的琼脂糖凝胶电泳，显示出基因组 DNA 条带(图 2)。扩增后 PCR 检测 DNA 质量显示出 PCR 产物条带(图 3)。

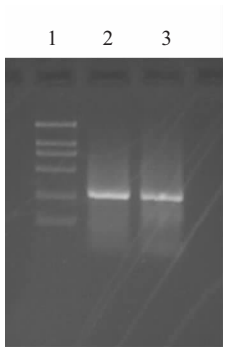



1：Marker(Takara 公司，DL 2 000，由上至下：2 000bp、1 000bp、750bp、500bp、250bp、100bp)；2：老年肝基因组 DNA 样本；3：老年脾基因组 DNA 样本

**图 2 肝、脾组织基因组 DNA 电泳**

## 2.4 肝、脾基因组 DNA 含量的比较

比较同时选取同一肝组织、脾组织的 32 例尸检者，显示肝组织平均 DNA 含量(0.877 ± 0.658) mg/mL，显著低于脾组织平均 DNA 含量(1.453 ± 0.867) mg/mL，$P < 0.05$，差异有统计学意义。




1：Marker(Takara 公司，DL 2 000，由上至下：2 000bp、1 000bp、750bp、500bp、250bp、100bp)；2：高龄老人组肝 VDR 基因 PCR 产物；3：高龄老人组脾 VDR 基因 PCR 产物

**图 3 肝、脾 VDR 基因 PCR 产物电泳**

## 3 讨论

衰老是指在正常状况下生物发育成熟后，随年龄增加，自身机能减退，内环境稳定能力与应激能力下降，结构、组分逐步退行性变，趋向死亡的不可逆转的现象[2]。衰老的过程漫长而复杂，要到老年期通过系统功能失调、器官功能衰退等变化逐渐表现出来。影响衰老的因素很多，遗传、各种社会因素、营养、疾病、环境及精神状态等都起着一定的作用，目前还没有一种理论能解释所有的衰老现象。肝、脾作为人体最重要的代谢解毒和免疫器官之一，其功能的减退也和衰老密切相关。

遗传物质 DNA 作为生物信息的源泉，控制着生命体的形成、生长、发育、成熟的全过程。它与衰老理所当然有着密切的联系，肝脾器官功能减退与 DNA 改变也密切相关。多项研究已经发现无论是人类还是老鼠，线粒体 DNA 随年龄的增加而缺失，尤以脑部最为明显[3]。随着年龄的增加，人类肝线粒体 DNA 随年龄增加而缺失，并与线粒体功能下降及氧化应激相关，对衰老发展起到重大的作用[4]。

过往研究多集中在线粒体 DNA，针对人类衰老与基因组 DNA 变化的研究尚缺乏。基于上述理论及研究，我们设想基因组 DNA 含量变化也可能与衰老和长寿有相关性。我们对不同年龄阶段老年人尸检肝脾组织基因组 DNA 含量进行研究。对提取的器官基因组 DNA 进行品质检测，紫外光谱检测 DNA 纯度较为理想，PCR VDR-Fok I 基因片段检测 DNA 的完整性也较

好,提取的 DNA 可满足实验的要求。研究结果显示,在肝脾组织中,65 ~ 79 岁老年人基因组 DNA 含量均显著高于 80 ~ 89 岁老年人,提示老年人随年龄的增长,基因组 DNA 为之减少。这与 Cui 等[4] 对肝线粒体 DNA 的研究结果相似。目前针对人脾组织进行基因组 DNA 检测的相关研究缺乏。有动物实验通过测定不同日龄果蝇 DNA 的含量变化发现,1 日龄的雄果蝇从每 100 mg 干组织 147 g 下降到 102 g[5]。DNA 损伤积累学说认为随年龄的增长,细胞 DNA 的合成能力和 DNA 的修复功能均下降,老年细胞的 DNA 复制能力也明显低于年轻细胞,DNA 损伤在含量上表现出减少的现象,这可能是本研究发现随年龄增长基因组 DNA 减少的原因。

但是本研究结果同时显示超过 90 岁老年人的 DNA 含量却显著高于 80 ~ 89 岁老年人。目前未见相关报道,但是有与长寿老人相关的反常发现。Zheng[6] 的研究证实,90 岁以上的长寿老人与一般老年人相比确实存在某些等位基因的差异,这些等位基因的差异使 90 岁以上老人患某些疾病的概率降低;耿艳等[7] 研究发现 90 岁以上的老年人肾脏 CaBP 表达反而高于 80 ~ 89 岁老人,也提示了 90 岁以上的长寿老年人存在着特殊性;吴青等[8] 在对大样本骨密度相关检测研究也发现 90 岁组大多数值有增高的趋势。本研究结果的差异考虑可能与 90 岁以上的长寿老年群体的分子差异有关。有研究显示,衰老及长寿基因、端粒、线粒体 DNA 单倍型和 DNA 甲基化等质变都会影响衰老进程[9]。在衰老过程中,DNA 损伤在含量上表现出减少的现象,某种意义上说,在一定程度上是因为削弱了 DNA 修复与复制的能力,导致了机体衰老[10]。同样,90 岁以上的长寿老年群体可能因为长寿基因、端粒及外环境等原因,在延长寿命的同时保持了 DNA 修复能力,延缓了细胞的衰老,所以在一定程度上减少了 DNA 数量的损伤。

本研究还发现同一尸检者肝组织 DNA 含量显著低于脾组织 DNA 含量,提示不同脏器组织 DNA 含量存在差异。究其可能原因有:①血 - 脾屏障结构发挥着重要作用,使得机体很少受到内、外环境损伤,并且我们在尸检过程中也很少发现在脾脏中有较为明显的病变(如肿瘤),保证了脾脏 DNA 的完好性;②脾脏内充满了大量的淋巴细胞,在同一重量下,主要存在于细胞核内的遗传物质基因组 DNA,推测也会相应含量增加;③既往有研究显示脾细胞核 DNA 随死亡时间延长呈现较好的下降梯度,而肝脏则由于自溶较快,死后 6 h细胞核 DNA 含量已很低[11],影响了肝脾 DNA 含量的比较。

人体衰老过程是人体内部环境各因素间、人体与外环境各因素间在生命活动的过程中不断相互作用、相互影响的综合性结果,衰老的原因是多方面的,衰老的机理也是极为复杂的。本研究尸检标本稀有,具有一定局限性。既往有研究提示人器官 DNA 含量随死亡时间增加而降低[11]。由于实际条件限制,本研究尸检时间未能严格控制,不能避免死亡时间对 DNA 溶解的影响。90 岁以上的长寿人群是否有着其分子机制的特殊性也有待进一步研究。本研究为不同年龄老年人的肝脾 DNA 含量提供了参考数据,为以后的衰老相关研究提供了实验数据。

## [参考文献]


[1] 罗光华,靳俊峰,高翠莲,等. 人死亡后特定条件下骨髓细胞核 DNA 降解与死后时间间隔推断[J]. 第四军医大学学报,2009,30(7):661 - 663.

[2] Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process[J]. Endocrine, 2006, 29(1):27 - 32.

[3] Kazachkova N, Ramos A, Santos C, et al. Mitochondrial DNA damage patterns and aging:revising the evidences for humans and mice[J]. Aging Dis, 2013, 4(6):337 - 50.

[4] Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging[J]. J Signal Transduct, 2012, 2012:646354.

[5] 龚 萍,印大中. DNA 与衰老[J]. 激光生物学报,2003,12(1):71 - 75.

[6] Zheng HX. The relationship between polymorphism of angiotens in -converting enzyme gene and disease of people[J]. Chin J Clin Med, 2006, 12(5):975 - 976.

[7] 耿 艳,张红红,胡亚卓,等. 钙结合蛋白 D28k 在不同年龄老年人肾组织中的表达[J]. 中华保健医学杂志,2013,15(5):403 - 406.

[8] 吴 青,陶国枢,刘晓玲,等. 北京市区 1333 人双能 X 线骨密度测定及骨质疏松症患病情况调查[J]. 中国骨质疏松杂志,1995,1(1):76 - 80.

[9] 王博雯,李应东,姚 凝. 衰老机制的分子水平研究进展[J]. 医学综述,2011,17(22):3370 - 3373.

[10] Ongvari Z, Krasnikov BF, Csiszar A. Testing hypotheses of aging in long-lived mice of the genus Peromyscus association between longevity and mitochondrial stress resistance ROS detoxification pathways and DNA repair efficiency[J]. Age (Dordr), 2008, 30(2 - 3):121 - 133.

[11] 陈 新,沈忆文,顾云菊,等. 组织细胞 DNA 含量变化与死亡时间的相关性研究[J]. 法医学杂志,2005,21(2):115 - 117.


(编辑:左艳芳)