DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.023
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2119-04

论著

缺氧过程中大鼠脑 mtDNA 编码 12S rRNA 和 COXⅠ mRNA 表达的变化

柳君泽,谭小玲,曹利飞 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原生理与高原病重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠经不同时间低压缺氧暴露后脑皮质mtDNA编码12S rRNA和细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase, COX)亚基Ⅰ mRNA表达的变化。方法 健康雄性Wistar大鼠在模拟海拔5 000 m高原低压舱内每天缺氧暴露23.5 h,分别连续缺氧2、5、15、30 d,对照组不做缺氧处理。断头活杀后取脑皮质,提取组织总RNA,以β-actin为内参照,反转录PCR法分析12S rRNA和COXⅠ mRNA的表达量。结果 缺氧2 d,12S rRNA的表达比对照组显著升高57%($P<0.05$),缺氧5 d以后恢复至正常对照组水平($P>0.05$);COX亚基Ⅰ mRNA表达在缺氧2 d和5 d显著升高($P<0.01$),分别比对照组升高55%和106%,缺氧15 d和30 d恢复至正常,与对照组无显著性差异($P>0.05$)。结论 缺氧暴露可同时影响mtDNA蛋白编码基因和核糖体基因的表达,提示缺氧可在转录与翻译两个水平上影响氧化磷酸化基因的表达,且其变化与缺氧暴露时间有关。

关键词:缺氧;线粒体DNA表达;12S rRNA;细胞色素氧化酶亚基Ⅰ mRNA
中图法分类号:R322.81;R394.2;R845.22 文献标识码:A

Changes of expression levels of 12S rRNA and COX Ⅰ mRNA encoded by mtDNA in rat brain during hypoxic exposure

LIU Jun-ze, TAN Xiao-ling, CAO Li-fei (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the changes of expression levels of 12S rRNA and cytochrome oxidase subunit Ⅰ (COXⅠ) mRNA encoded by mtDNA in rat cerebral cortex after rat exposure to hypobaric hypoxia for different days. **Methods** Healthy male Wistar rats were exposed to hypobaric chamber simulating 5 000 m above sea level (23.5 h/day) for 2, 5, 15 and 30 d. Rats in the control group were not exposed to hypoxia. Rats were sacrificed by decapitation. Total RNA in cerebral cortex was extracted using a standard program. Transcriptional levels of 12S rRNA and COXⅠ mRNA were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with that in the control, the expression of 12S rRNA increased by 57% after hypoxic exposure for 2 d ($P<0.05$), but restored to the level in the control group after hypoxic exposure for 5 d ($P>0.05$). Compared with that in the control group, the expression of COXⅠ mRNA increased significantly by 55% and 106% after hypoxic exposure for 2 and 5 d ($P<0.01$), but restored to the level in the control group after hypoxic exposure for 15 and 30 d ($P>0.05$). **Conclusion** Hypoxic exposure may have effect on both protein gene and ribosome gene expression encoded by mtDNA, and the expression changes in a hypoxic exposure time-dependent manner. This suggests that hypoxia can have effect on mitochondrial oxidative phosphorylation gene expression at both mitochondrial transcriptional and translational levels.

Key words: hypoxic exposure; mtDNA expression; 12S rRNA; cytochrome oxidase subunit Ⅰ mRNA

哺乳动物线粒体DNA(mtDNA)全长16.5 kbp,编码2个rRNA、22个tRNA和呼吸链多酶复合体13个亚基的mRNA。mtDNA的复制与表达有别于细胞核基因组,不受细胞周期的限制,是在线粒体内独立进行的,因而有其固有的特性[1]。研究表明,甲状腺素、药物等因素均可影响mtDNA的表达[2,3]。由于mtDNA的编码信息为呼吸链的重要组成成分,与线粒体氧化磷酸化和能量代谢有直接关系,因而对其结构和功能的研究已受到广泛重视。氧主要在线粒体被利用,缺氧过

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070290)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070290)
作者简介:柳君泽(1961-),男,山西省运城市人,硕士,主要从事缺氧病理生理方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68752340-8205
收稿日期:2003-09-02;修回日期:2003-10-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

程中的能量代谢平衡在机体对缺氧的适应中起关键性作用。本研究利用反转录 PCR 技术，观察大鼠经不同时间低压缺氧暴露后 mtDNA 重链(H-链)编码的 12S rRNA 和细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase，COX)亚基Ⅰ mRNA 转录物表达的变化，探讨线粒体遗传信息表达与氧化磷酸化的关系，揭示缺氧对细胞损伤和机体缺氧耐受的能量代谢机制以及对揭示机体高原缺氧习服与适应的机制都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

11～13周龄健康雄性 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)，体质量 150～230 g。RNA 提取试剂 Tripure 为德国 Boehringer Manheim 公司产品；DEPC、RNasin、M-MulV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker、溴化乙啶均购自上海生工生物工程公司；PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验模型与分组

30只大鼠按体质量分为5组(每组6只)：正常对照组、低压缺氧暴露2 d组(2 d)、5 d组(5 d)、15 d组(15 d)和30 d组(30 d)。各缺氧组动物分别于模拟海拔5 000 m高原低压舱内(大气压54 kPa、氧分压11.3 kPa、舱内温度18～23 ℃)23.5 h/d(其中每天返回平原0.5 h以清扫、喂食)连续缺氧暴露至相应时间，正常对照组动物于舱外同时饲养。全部动物饲以颗粒饲料(购自本校动物实验中心)，照明12 h/d，自由饮水。至相应时间后，对照组和缺氧组大鼠分别在舱外和模拟高原低压舱内断头处死，分离大脑皮质，冰冷生理盐水清洗、称重，液氮保存备用。

1.3 实验方法

应用 Tripure 试剂抽提脑组织总 RNA(含细胞器 RNA)，75%乙醇清洗2遍，沉淀用 DEPC 处理的去离子水溶解。反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测 mtDNA 的表达产物 12S rRNA 和 COXⅠ mRNA 的表达量，以β-actin 作为内参照，分别与目的基因于同一系统中共扩增。PCR 引物见表1。

表1 12S rRNA、COXⅠ和β-actin mRNA的RT-PCR引物序列、位置与扩增片段长度

Tab 1 Primer sequence, position, and length of RT-PCR-amplified products of 12S rRNA and COXⅠ mRNA and β-actin mRNA

	Objective gene	Primer sequence	Position in mtDNA	Fragment length
12S	Reverse primer	5′-AGCCACCGCGGTCATACGAT-3′	609～628	318
	Forward primer	5′-GAACAGGCTCCTCTAGATGG-3′	310～329	
COXⅠ	Reverse primer	5′-GCTTCCGAAACTGACTTGTACC-3′	5 898～5 991	381
	Forward primer	5′-GCTGCTAATACTGGCAGTGAGA-3′	5 538～5 559	
β-actin	Upstream primer	5′-CCTAGCACCATGAAGATCAA-3′		243
	Downstream primer	5′-AGCCATGCCAAATGTCTCAT-3′		

逆转录反应混合液中含样品总 RNA 4.0 μg，oligo(dT)$_{18}$ 1 μg，12S 和 COXⅠ的 reverse primer 各20 pmol/L，70 ℃变性5 min后，加入 dNTP 各20 nmol/L，RNasin 0.5 U，M-MuLV 逆转录酶200 U，于42 ℃反应60 min，70 ℃变性10 min后终止反应。同时设立不含样品的阴性对照。反应产物于－20 ℃保存备用。

分别将12S、COXⅠ的 cDNA 与内参照β-actin 的 cDNA 进行共扩增。50 μl 的 PCR 体系中含 cDNA 2 μl，12S 和 COXⅠ的 reverse primer 和 Forward primer 各20 pmol，β-actin 的上游与下游引物各15 pmol，dNTP 各20 nmol，Taq DNA 聚合酶5 U，于95 ℃变性5 min后，每个 PCR 循环95 ℃变性75 s，52 ℃退火60 s，72 ℃延长60 s，共30个循环。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳。凝胶拍照后，经 Gel Doc 2000 凝胶图象分析系统记录并计算 12S/β-actin 和 COXⅠ/β-actin 的 IOD 比值。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计学处理采用 SPSS10.0 统计软件的单因素方差分析，各组均值间显著性差异的多重比较采用 Newman-Keuls 法。

2 结果

2.1 提取 RNA 的鉴定

从大鼠脑组织提取纯化的 RNA 样品，经0.8%甲醛琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S、5S RNA 的清晰条带，RNA 纯度用 A_{260}/A_{280} 比值鉴定，其比值在1.85～2.03之间。

2.2 大鼠缺氧过程中脑线粒体 12S rRNA 的表达

低压缺氧可影响大鼠脑 mtDNA 重链(H-链)编码的12S rRNA 表达，并且随缺氧暴露时间而改变。缺氧2 d组其表达比对照组升高57%，差异有显著意义($P<0.05$)，随后下降，缺氧5 d以后恢复至正常对照组水平($P>0.05$)，见图1、2。

2.3 大鼠缺氧过程中脑线粒体 COX 亚基Ⅰ mRNA 的表达

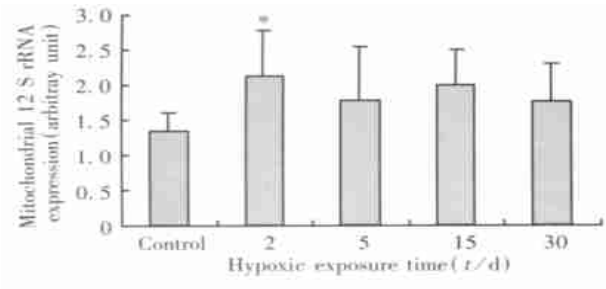
低压缺氧暴露对大鼠脑 mtDNA(H-链)编码的 COX 亚基Ⅰ mRNA 表达的影响与缺氧暴露时间有关，缺氧2 d和5 d其表达分别比对照组升高55%和106%，与对照组和其它各组比较，差异均有非常显著意义($P<0.01$)；缺氧15 d和30 d恢复至正常水平($P>0.05$)，见图3、4。



图1 大鼠脑线粒体12S rRNA的RT-PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR-amplified products of 12S rRNA of rat cerebral mitochondria

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



*: $P<0.05$ *vs* control

图 2　缺氧过程中大鼠脑皮质线粒体 12S rRNA 的表达

Fig 2　Expression of mitochondrial 12s rRNA in rat cerebral cortex during hypoxic exposure

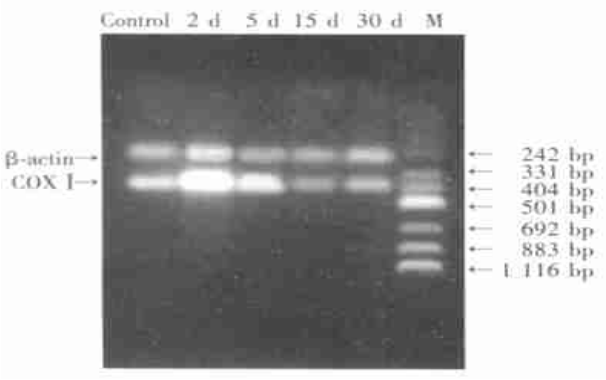
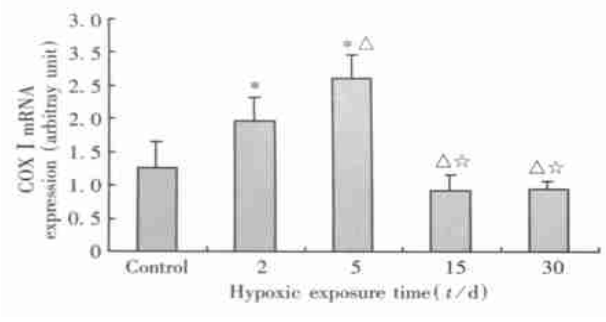


图 3　大鼠脑线粒体细胞色素氧化酶亚基Ⅰ mRNA 的 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 3　Agarose gel electrophoresis of RT-PCR-amplified products of COXⅠ mRNA of rat cerebral mitochondria



*: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.01$ *vs* 2 d; ☆: $P<0.01$ *vs* 5 d

图 4　缺氧过程中大鼠脑皮质线粒体细胞色素氧化酶亚基 mRNA 的表达

Fig 4　Expression of mitochondrial COXⅠ mRNA in rat cerebral cortex during hypoxic exposure

3　讨论

机体 80%~90%的 O_2 是在线粒体被利用。研究证实, 缺氧可显著影响线粒体的氧化呼吸功能, 从而影响氧的利用和能量生成的效率, 这是导致缺氧时细胞乃至机体病理生理改变的基础。模拟 4 300 m 高原间断缺氧 21 d 小鼠的脑线粒体呼吸氧耗降低 47%, 同时呼吸链 NADH-COQ 还原酶(复合体Ⅰ)活性显著降低[4], 而 COXⅠ 复合体Ⅳ)活性降低 12%[5]。我们以往研究发现, 模拟 4 000 m 高原连续缺氧 3 d 的大鼠脑线粒体氧化呼吸速率、ATP 合成速率以及 ATP 合成酶(复合体Ⅴ)活性均显著抑制[6], 而模拟 5 000 m 高原连续缺氧大鼠的脑皮质 COX 活性, 在 30 d 内均表现为抑制效应, 其中在第 15 天可抑制 42.4%[7]。这些结果提示缺氧可影响线粒体呼吸器的质(活性)或量而影响细胞的能量代谢。

线粒体呼吸和 ATP 的合成是依靠内膜上的电子传递链和 ATP 合成酶来完成的, 这些酶复合体都是多亚基组成, 由细胞核 DNA(nDNA)和 mtDNA 共同编码。mtDNA 是一个封闭的双链环状分子, 其遗传信息的复制、转录和翻译都是在线粒体内独立进行的。在哺乳动物 mtDNA 编码的 37 个基因中, 有 13 条多肽为电子传递链和 ATP 合成酶的部分亚基, 而 2 个 rRNA 和 22 个 tRNA 则与这些多肽在线粒体内的翻译合成有关, 因此缺氧时线粒体的氧化呼吸功能改变与 mtDNA 的表达状况密切相关。最近, Vijayasarathy 等[8] 研究了小鼠的单核巨噬细胞、C2C12 骨骼肌细胞和大鼠 PC12 细胞缺氧时线粒体的功能以及 mtDNA 和 nDNA 编码基因的表达, 发现缺氧不仅可以使线粒体的功能普遍降低, 使得细胞总 ATP 库(Pools)和总血红素含量明显减少, 而且由 mtDNA 编码的 COXⅠ和Ⅱ mRNA 以及由 nDNA 编码的 COXⅣ和 Vb mRNAs 的表达均显著下调, 并且线粒体的转录速度严重降低; Bae 等[9] 应用差异显示技术发现, 缺氧也可使 $HepG_2$ 肝癌细胞 COXⅡ和 ADP/ATP 转运酶表达下调; Sauleda 等[10] 报道伴有呼吸衰竭的 COPD 病人(PaO_2<60 mmHg)骨骼肌线粒体 COX 活性显著高于健康对照组, 并且酶活性与 PaO_2 呈负相关, 同时发现 12S rRNA 表达则显著升高。这些结果提示缺氧对线粒体功能的影响与 mtDNA 的表达有关。本实验在对大鼠整体缺氧暴露不同时间后研究显示, 脑线粒体 COXⅠ mRNA 和 12S rRNA 的表达在缺氧一定时间(2 d 和 5 d)后则均显著升高, 表明缺氧暴露不仅可以影响 mtDNA 编码蛋白基因的表达, 而且还影响 rRNA 的表达。12S rRNA 是构成动物线粒体核糖体 28S 小亚基的重要组成成分(36S 大亚基由 16S rRNA 构成), 参与线粒体内蛋白质的翻译过程[11], 因而揭示缺氧可通过影响线粒体核糖体数目达到对蛋白翻译过程的调节, 提示缺氧暴露可以在转录与翻译两个水平上影响 mtDNA 编码氧化磷酸化基因的表达。

实验还显示, 大鼠脑 mtDNA 转录物水平的变化与 COX 活性[7] 的变化并不一致, 这与 Vijayasarathy 等[8] 报道的呼吸衰竭(慢性缺氧)病人骨骼肌 COX 活性增加而 COXⅠ mRNA 则无改变和 Barazzoni 等[11] 报道衰老大鼠骨骼肌 COX 活性降低但其转录物水平则无改变

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的结果相似,反映了氧化酶功能的调节不仅与其编码基因的转录物水平有关,而且提示缺氧对其活性的影响可能还涉及其它因素。关于缺氧对 COX 活性调节的机制目前并不清楚,可能不仅与酶蛋白的量有关[12],而且还与细胞内外环境(细胞 pH、代谢物、自由基等)有关[13]。另外,虽然 COX Ⅰ为 COX 复合体 13 个亚基中最大的一个亚基,但其它亚基(包括 mtDNA 和 nDNA 编码)的表达量也势必会酶蛋白的活性产生影响。

实验同时显示,大鼠缺氧暴露过程中,脑 mtDNA 转录物水平与缺氧暴露的时间有关,在缺氧 2 d COX Ⅰ mRNA 和 12S rRNA 分别比对照升高 55%和 57%,而缺氧 5 d COX Ⅰ mRNA 则可升高 106%,缺氧 15 d 后则均已恢复对照水平,这与呼吸衰竭(慢性缺氧)病人骨骼肌线粒体仅 12S rRNA 水平升高(但 COX Ⅰ mRNA 不变)[8]有相似之处,这种 mtDNA 转录物随缺氧时间变化的特性是组织对缺氧反应的一种现象还是一种适应机制尚不得而知,有待深入研究。

比较本实验结果与上述相关作者的报道表明,缺氧对 mtDNA 编码基因表达的影响在整体和培养的细胞是不一样的,Vijayasarathy 等[8]和 Sauleda 等[10]报道缺氧降低体外培养细胞的线粒体基因表达,而本实验显示整体缺氧暴露则可使动物的脑组织 mtDNA 编码基因(COX Ⅰ和 12S)的表达升高,与 Sauleda 等[10]报道的慢性缺氧病人骨骼肌 12S rRNA 的表达结果一致,这提示病理情况下机体组织内线粒体基因组表达调节的复杂性,可能与细胞内环境等多种因素有关。

参考文献:

[1] 章静波,林建银,杨 恬. 医学分子细胞生物学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2002. 87-94.

[2] Enriquez J A, Fernandez S P, Garrido P N, *et al*. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(1): 657-670.

[3] Birkus G, Hitchcock M J M, Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(3): 716-723.

[4] Chavez J C, Pichiule P, Boero J, *et al*. Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia[J]. Neurosci Lett, 1995, 193(3): 169-172.

[5] Caceda R, Gamboa J L, Boero J A, *et al*. Energetic metabolism in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia[J]. Neurosci Lett, 2001, 301(3): 171-174.

[6] 高文祥,柳君泽,吴利平,等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 879-882.

[7] 谭小玲,柳君泽,曹利飞,等. 长时间缺氧对大鼠脑皮质线粒体细胞色素氧化酶活性及亚基Ⅰ、Ⅳ蛋白表达的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2002, 13(4): 239-242.

[8] Vijayasarathy C, Damle S, Prabu S K, *et al*. Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(5): 871-879.

[9] Bae M K, Kwon Y W, Kim M S, *et al*. Identification of genes differentially expressed by hypoxia in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243(1): 158-162.

[10] Sauleda J, Garcia P F, Wiesner R J, *et al*. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(5 Pt 1): 1413-1417.

[11] Barazzoni R, Short K R, Nair K S. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart[J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3343-3347.

[12] Burke P V, Rait D C, Allen L A, *et al*. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c oxidase genes in yeast[J]. J Biol Chem, 1997, 272(23): 14705-14712.

[13] Burke P V, Poyton R O. Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase[J]. J Exp Biol, 1998, 201(P8): 1163-1175.

(编辑 栾 嘉)

(上接2118页)

匿性破裂,占脾破裂病人的3%~4%[1],与不同原因引起的脾肿大有关,多见于感染性单核细胞增多症、病毒性肝炎,白血病等病人。本例发生自发性破裂的机制可能与病理脾质地脆弱、脾肿大、劳动时腹压骤升等因素有关;此外,脾功能亢进、凝血功能障碍亦可能加重破裂后出血。

临床资料显示25%~40%肝硬变合并食道静脉曲张病人,在1年内发生曲张静脉破裂出血[2]。出血时如急诊行断流术,常因病人全身情况差,手术耐受力差,血管离断不彻底,术后再出血率达41%[3]。因此,多数人认为病理脾发展到自发性破裂的程度,其功能已部分或全部丧失,保脾后有再破裂大出血可能,应行脾切除术[4]。门奇静脉断流加脾切除术治疗门脉性肝硬变的效果,已得到普遍肯定,但在急诊情况下预防性断流术治疗门脉性肝硬变,尚有争议。我们认为自发性病理脾破裂时,脾切除加预防性断流术对该类病人的治疗具有积极意义:①止血效果确切,使病人在发生曲张静脉破裂出血前,得到有效的治疗;②能改善肝功能和全身情况,防止并发症和提高再次手术的耐受性。但施行手术应严格掌握适应症,对肝功能属A~B级、脾肿大且伴有脾功能亢进、术中血液动力学稳定、估计能耐受较长时间手术的病人,行此手术是安全、有效的。

关键词:门脉性肝硬变、自发性脾破裂、门奇断流术
中图法分类号:R657.31 文献标识码:B

参考文献:

[1] 夏穗生. 现代腹部外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1996. 508-516

[2] 薛迪广,杨文彬. 食道静脉曲张破裂出血56例急诊手术后并发症处理的体会[J]. 腹部外科, 1994, 7(2): 74-75

[3] 袁荣文,覃修福,夏穗生. 自发性脾破裂引起腹腔内大出血附14例临床分析[J]. 中国实用外科杂志, 1997, 17(7): 407-408.

[4] Grace N D. Prevention of initial variceal hemorrhage[J]. Gastroenterol Clin North Am, 1992, 21(1): 149-161.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net