DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.011
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0961-04

论著

失血性休克肠上皮细胞线粒体 DNA ATPase 6,8 亚基基因的改变

李伟文,陆松敏,刘建仓,武 凡,柏干荣,李 萍 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观察失血性休克大鼠肠上皮细胞 mtDNA ATPase 6,8 亚基基因的改变。方法 将 6 只 Wistar 大鼠分成单纯手术组、休克组。分别提取 mtDNA,采用 PCR 技术扩增后测序,检测突变点。结果 Wistar 大鼠 mtDNA ATPase 6,8 亚基基因存在多态性,休克组存在 A 7797 缺失和一定数量点突变:A7863G, G7950T, C8294G, T8505G。结论 失血性休克 5 h,肠上皮细胞 mtDNA ATPase 6,8 亚基基因会发生突变,由此可导致所编码的氨基酸的改变,有可能是酶活性改变的原因。

关键词:失血性休克;线粒体 DNA;ATPase 6 基因;ATPase8 基因;多态性;突变
中图法分类号:R322.45;R394.3;R605.971 文献标识码:A

Study on the changes of mitochondrial DNA ATPase 6 and 8 subunit genes of small intestine epithelial cells in hemorrhagic shock rats

LI Wei-wen, LU Song-min, LIU Jian-cang, WU Fan, BAI Gan-rong, LI Ping (Department 2, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the changes of mitochondrial DNA ATPase 6, 8 subunit genes of small intestine epithelial cells in hemorragic shock rats. Methods Six rats were randomly divided into the control and shock groups, from which mtDNA was extracted, respectively. The sequences were examined after amplification by polymerase chain reaction (PCR) to detect mutation sites. Results The polymorphism existed at some sites of ATPase 6, 8 genes of Wistar rats. There was an A 7797 deletion and several site mutations of ATPase 6,8 subunit genes in shock 5h group, namely, A 7863 G, G 7950 T, C 8294 G and T 8505 G. Conclusion The mutation of ATPase 6, 8 subunit genes at the 5th h may result in the changes of their coding amino acids, which might be due to the changes of F_0F_1-ATPsynthase activity.

Key words: shock; mtDNA; ATPase 6 gene; ATPase 8 gene; polymorphism; mutation

失血性休克(以下简称休克)时,机体出现低灌流,产生毒性物质,使细胞发生代谢障碍,功能结构出现损害;细胞线粒体 ATP 合成受抑制。小肠在休克后能量代谢损伤较早,而且 mtDNA ATPase 6,8 亚基基因与细胞线粒体能量代谢关系非常密切。但休克后缺血缺氧条件下能量代谢障碍与 mtDNA ATPase 6,8 亚基基因改变关系如何,尚未见文献报道。本实验探讨了休克后缺血缺氧条件下肠上皮细胞线粒体 DNA(mtDNA)ATPase 6,8 亚基基因(ATPase 6,8 基因)的突变情况,为研究严重创伤缺血时主要脏器细胞线粒体氧利用障碍发生机制打下基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973 项目")(G1999054202)
作者简介:李伟文(1971—),男,甘肃省甘谷县人,硕士,医师,主要从事缺血缺氧线粒体基因改变方面的研究。电话:(023)68757432
通信作者:陆松敏,电话:(023)68757232
收稿日期:2002-06-06;修回日期:2002-08-11

1 材料与方法

1.1 试剂

本实验所用试剂均系国产分析纯试剂。

1.2 模型[1]和分组

健康 Wistar 大鼠 6 只,体质量(250±20) g,由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物室提供,随机分为 2 组:①对照组,②休克组,每组 3 只。动物禁食过夜,3%戊巴比妥钠 1 ml/kg 腹腔麻醉,行右股动脉插管,连接三通。休克组放血(约 10 min)降至 5.32 kPa(40 mmHg)维持 2 h,观察 3 h。对照组仅予腹腔麻醉,插管。

1.3 肠上皮细胞分离

参照文献[2]并加以改进分离肠上皮细胞。

1.4 mtDNA 提取

用改进高盐沉淀法[3]提取 mtDNA。所提取 mtDNA 沉淀加入适量 RTE 液溶解,贮于 4 ℃。

1.5 紫外分光光度法测定

样品经适当稀释,用 BECKMAN DU 7500 紫外分光光度计

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

定量。

1.6 PCR 检测肠上皮细胞 mtDNA ATPase 6,8 基因突变

1.6.1 PCR引物 上海博亚生物工程公司设计并合成。

1A: 5′-ACAATGACATGCCACAAC-3′, 1B: 5′-GGGAA-CATAATAATGGTCAC-3′; 2A: 5′-AAACGAATAACCCTTGAGAATC-3′, 2B: 5′-TG-GTGGGTCATTATGTGTTATC-3′。分别组成两对引物,扩增 248 bp 和 715 bp。

1.6.2 PCR方法 PCR 标准反应体系总体积为 50 μl。条件如下:加入 10× buffer 5 μl $MgCl_2$(25 mmol/L) 3.6 μl, 4× dNTP 3.6 μl,引物(0.5 μl/μg)各 1.4 μl,模板(0.3 μg/μl)10 μl,PCR用水27 μl,液状石蜡 23 μl,95 ℃预变性 220 s,加入 TaqDNA 聚合酶 0.9 μl。循环条件,95 ℃变性 40 s,72 ℃延伸 36 s(扩增 715 bp 时为 60 s),55 ℃退火 30 s,反应 30 个循环,72 ℃延伸 10 min。

1.6.3 PCR产物鉴定 用 2%琼脂糖凝胶,取 4 μl 产物与 1 μl 上样液混合后点样,与 BD Ladder Marker 比较。100 V,4 min;55 V,20 min 后紫外灯下观察并拍照。将 PCR 产物送北京博大泰克等公司进行序列测定。

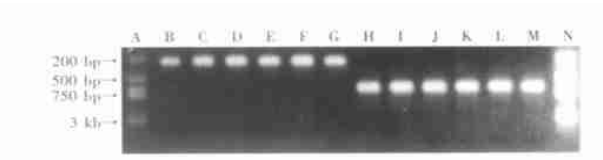
2 结果

2.1 mtDNA 的紫外吸收光谱分析

mtDNA 样品浓度为 11~14 μg/μl。D_{260}/D_{280} 为 1.75~1.80。

2.2 PCR 产物电泳图谱

大鼠肠上皮细胞 ATPase 6,8 基因扩增产物大小分别为 715 bp 和 248 bp,强弱基本一致,所处位置相同,见图 1。



A, N: BD 2000 marker; B, C, D, H, I, J: control group; E, F, G, K, L, M: shock group; B, C, D, E, F, G: ATPase 6 gene PCR amplification product; H, I, J, K, L, M: ATPase 6 and 8 genes PCR amplification product

图 1 ATPase 6,8 亚基基因 PCR 产物电泳图谱

Fig 1 Electrophoretogram of mitochondrial DNA ATPase 6 and 8 subunit genes PCR amplification product

2.3 ATPase8 亚基基因序列测序结果

大鼠肠上皮细胞 mtDNA ATPase8 基因序列共检测 6 个动物 20 份标本,将结果与 Rattus norvegicus (Wistar) mitochondrial genome 进行相似性比较,见表 1。结果说明两组大鼠均见有 7 871位碱基 C 突变为 T (C7 871T)(同义突变),标本检出比为 15/20,动物检出比为 5/6。

表 1 mtDNA ATPase8 亚基基因测序结果一览表

Tab 1 The compendium of mtDNA ATPase 8 subunit gene sequencing results

Group	Animal number	Animal condition	Sample number and sequencing corporation	Changes of ATPase 8 gene												
Control	1	255 g ♀	1-1 #	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			2-3 #	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			3-5 #	—	—	C7 871T	A7 868G	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			3-7 #	—	—	C7 871T	A7 868G	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			1-8 #	—	—	C7 871T	A7 868G	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			2-f #	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			13/1a £	■	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			1 ν	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
	2	248 g ♀	35 *	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
	3	247 g ♀	46/1a #	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			46/1b #	—	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
Shock 5 h	1	246 g ♂	14/1a #	—	★	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			14/1b #	■	—	C7 871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			14/1b £	—	—	C7 871T	—	▼	—	--	--	--	--	--	--	--
	2	252 g ♂	15/1a #	—	★	--	—	—	T7 772C	--	--	--	--	--	--	--
			15/1a £	—	—	C7871T	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			16/1a #	—	★	--	—	—	T7 772C	--	--	--	--	--	--	--
	3	255 g ♀	16/1a £	—	★	--	—	—	—	--	--	--	--	--	--	--
			16/1b £	—	—	--	—	▼	—	--	--	--	--	--	--	--
			5 ν	—	—	--	—	—	—	A7 863G	--	--	--	--	--	--

ν, #, £ and * represent Shanghai Bioasia, Beijing Biodevc Tech, Shanghai Shengyou, and TaKaRa(Dalian) Biotechnology Co. Ltd. respectively; ■: (7 767-7 768)a; ★: a7 797 deletion; ▼: (7 934-7 935)c; —: no change

本实验发现缺血缺氧休克大鼠7 797 位碱基A 发生缺失(A 7 797 空)(缺失突变),另外还发现: T7 772C (同义突变),7 934-7 935C(插入突变)。

2.4 ATPase 6 亚基基因序列测序结果

大鼠肠上皮细胞mtDNA 7 904~8 584 区域 ATPase 6 亚基基因序列检测结果报告,共检测 6 个动物 6 份标本,见表 2。结果

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

进行相似性比较, 发现 T8 083C, G8 204A, T8 251C, C8 289T, C8 557G 基本上在所有大鼠中均检测到了。休克缺血缺氧大鼠除发现 1 例同义突变 C8 344T 外, 还发现 1 例突变 T8 505G, 使编码氨基酸改变, 使缬氨酸变为甘氨酸。

表 2　mtDNA ATPase 6 亚基基因测序结果一览表

Tab 2　The compendium of mtDNA ATPase 6 subunit gene sequencing results

Group	Animal number	Animal condition	Sample number and sequencing corporaTion	Changes of ATPase 6 gene													
Control	4	250G ♀	37/2A *	G7 966A	G8 006A	▽	—	○■◆	--	—	C8 437T	--	--	--	—	☆	—
	5	242G ♀	1/2A, 2A2ν	G7 966A	G8 006A	▽	—	○■◆	--	—	C8 437T	--	--	--	—	☆	—
	6	245 g ♀	2/2A, 2A2 ν	--	—	▽	T8 140C	○■◆	--	—	C8 437T	--	--	–	—	☆	—
Shock 5 h	1	255G ♂	19/2A #	G7 966A	G8 006A	▽	—	○■◆	--	C8 344T	--	--	--	--	—	—	—
	4	245 g ♀	3/2A, 2A2 ν	--	—	▽	T8 140C	○■◆	C8 294G	—	--	--	--	--	—	☆	—
	5	248 g ♂	4/2A, 2A2 ν	--	—	▽	T8 140C	○■◆	--	—	--	T8 505G	--	--	—	☆	—

ν, #, ℒ and * represent Shanghai Bioasia, Beijing Biodevc Tech, Shanghai Shengyou, and TaKaRa(Dalian) Biotechnology Co. Ltd. respectively; ■: T8 251C; ◆: C8 289T; ▽: T8 083C; ○: G8 204A; ☆: C8 557A; --: no change

2.5　休克大鼠肠上皮细胞 ATPase 6, 8 基因的改变

失血性休克 5 h, 大鼠肠上皮细胞 ATPase 6, 8 基因发生了突变, 突变情况及其意义如下, 见表 3。

表 3　mtDNA ATPase 6, 8 亚基基因突变分析($n=3$)

Tab 3　Mutation analysis of mtDNA ATPase 6 and 8 subunit genes($n=3$)

Mutation sites	Mutation type	Mutation ratio		Changes of coding amino acid
		Shock group	Control group	
A7 797	Deletion	3/3	0/3	frame shift
Deletion	Mutation			
T7 772C	Point mutation	2/3	0/3	Phe 9 Phe
A7 863G	Point mutation	1/3	0/3	Thr 40 Ala
▼	Insertion mutation	2/3	0/3	frame shift
C8 294G	Point mutation	1/3	0/3	Gln 130 Glu
T8 505G	Point mutation	1/3	0/3	Valine 200 Gly

2.6　大鼠肠上皮细胞 ATPase 6, 8 基因的多态性

本实验所采用的大鼠是由北京中国药品生物制品鉴定所实验动物中心(国家物种中心)提供的封闭种群 Wistar 大鼠。本研究发现, 两组大鼠 ATPase 6, 8 基因, 与 Rattus norvegicus(Wistar) mitochondrial genome 比较, 几处位点碱基均有改变, 见表 4。

表 4　mtDNA ATPase 6, 8 亚基基因多态性分析($n=3$)

Tab 4　Polymorphism analysis of mtDNA ATPase 6 and 8 subunit genes ($n=3$)

Mutation sites	Mutation type	Sample positive ratio	Mutation ratio		Changes of coding amino acid
			Control group	Shock group	
C7 871T	Point mutation	15/20	3/3	3/3	Ala 42 Ala
T8 083C	Point mutation	6/6	3/3	3/3	Leu 59 Leu
G8 204A	Point mutation	6/6	3/3	3/3	Asp 100 Asn
T8 251T	Point mutation	6/6	3/3	3/3	Gly 115 Gly
C8 289T	Point mutation	6/6	3/3	3/3	Ser 128 Leu
T8 557A	Point mutation	5/6	3/3	2/3	Val 217 Val

3　讨论

线粒体是细胞的能源中心。在细胞凋亡, 衰老及程序化死亡中发挥重要作用。mtDNA ATPase 6, 8 基因是编码 F_0F_1-ATPase 复合物 F_0 部分的基因。本实验研究了肠上皮细胞 mtDNA ATPase 6, 8 基因的多态性和休克时的突变情况。

3.1　失血性休克大鼠肠上皮细胞 ATPase 6, 8 基因的改变意义

mtDNA 通常与线粒体内膜结合, 编码呼吸链的一些必要成分。在多种疾病中发现 mtDNA 发生突变。本实验结果表明, 见表 3, ATPase 8 基因 7 797 位点 A 发生缺失, 休克组缺失率为 3/3, 而对照组为 0/3, 提示本突变和缺血缺氧密切相关, 该突变会使 mRNA 的阅读框架发生改变, 其结果可使氨基酸的组成发生改变, 生成功能异常或无功能的 ATPase 8 亚基蛋白, 直接影响了 F_0F_1—ATPase 的活性。而 7 934 ~ 7 935 插入 C 也会造成相同后果。本研究还发现该基因构象的其它改变, 7 863 位碱基由 A 变为 G (A7 863G), 编码的第 40 位氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸(苏氨酸 40 丙氨酸)。

ATPase 6 基因在失血性休克 5 h 时, C8 294G, 谷氨酰胺 130 谷氨酸; T8 505G, 缬氨酸 200 甘氨酸。这些突变只在休克组中发现, 说明与缺血缺氧也有一定关系。同时, 也检测到两处同义突变, 即 T7 772C, C8 344T, 编码氨基酸没有发生改变。

已有大量实验证明慢性缺氧时 mtDNA 改变与氧自由基有关[4~6]。ATPase 6 基因 T8 993G 突变, 在 ATP 酶 6 亚单位的第 4 个跨膜区造成一处由亮氨酸到

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

精氨酸的突变，此种突变引起 ATPase F_0 质子通道阻滞。体外培养含有 95%的突变型 mtDNA 的淋巴细胞内，ATP 合成能力仅占正常对照的 52%～67%[7]。

休克时 ATPase 6，8 基因发生碱基突变和缺失，此时表达如何改变，ATP 合成能力如何下降。还需进一步深入进行。

3.2 大鼠肠上皮细胞 ATPase 6，8 亚基基因多态性分析

本实验结果可能说明了我国 Wistar 大鼠 ATPase 6，8 亚基基因的多态性或遗传背景。特别是 C7 871T，考虑本实验室重复检测 20 次，应该认为本报告有一定的意义。C7 871T，T8 083C，T8 251C，C8 557G 为同义突变，而 G8 204A，使天冬氨酸 100 天冬酰胺；C8 289T，使丝氨酸 128 亮氨酸，值得进一步研究。本实验首次报告了同种族不同个体间 Wistar 大鼠 mtDNA ATPase 6，8 亚基基因因地域不同而可能存在多态性的碱基位点。

3.3 失血性休克后 mtDNA 损伤的原因及其有关的修复机制

休克时，自由基 O_2^- 和 NO·过量生成，并发生反应生成的 ONOO-，具有极强的氧化作用。此时线粒体成为 ONOO-细胞毒效应的关键靶位[8]。自由基可使 mtDNA 碱基羟化或断裂，导致损伤。mtDNA 对氧化性损伤具有有效的修复机制[9]。Yakes 等[10] 报道，连续低剂量 H_2O_2（约 15 μmol/L）15 min 内即可导致 SV40-转化的人纤维原细胞 mtDNA 损伤。用约 10 μmol/L H_2O_2 处理上述细胞 15 min，6 h 后损伤的 mtDNA 完全修复。

休克时，肠上皮细胞 mtDNA 的 ATPase 6，8 亚基基因发生改变，可导致编码氨基酸的改变。阻止这种改变，对休克的治疗有重要意义。

参考文献：

[1] Nakayama S E. Infusion of very hypertonic saline to bleed rats: membrane potential and fluid shifts[J]. J Surg Res, 1985, 38(2): 180－186.

[2] Desoignie R, Sellin J. Propionate-initiated changes in intra-cellular pH in rabbit coloncytes[J]. Gastroenterology, 1994, 107(2): 347－356.

[3] 伍新尧. 分子遗传与基因工程[M]. 郑州：河南医科大学出版社，1997. 37－38.

[4] Zullo S J, Cerritos A, Merril C R. Chronic hypoxia and brain mtDNA deletions[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 366(2): 240－248.

[5] 曾昭惠，于宏升，张宗玉，等. 小鼠衰老脑缺血时脑细胞线粒体 DNA 片段[J]. 中华老年医学杂志，1998, 17(3): 136－138.

[6] 周 林，万大方，张国元，等. 高血压患者及大鼠线粒体 ATPase 6 基因的克隆、表达与突变研究[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(10): 729－732.

[7] Santorelli F M, Shanske S, Jain K D, *et al*. A T→G mutation at mt 8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh syndrome[J]. Neurology, 1994, 44(5): 972－974.

[8] Schweizer M, Richer C. Peroxynitrite simultanes the pyridine nucleotide-linked Ca^{2+} release from intact rat liver mitochondria[J]. Biochemistry, 1996, 35(14): 4524－4528.

[9] Croteau D L, Bohr V A. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 5409－5412.

[10] Salazar J J, Hoyten B V. Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxiditive as a generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts[J]. Mutat Res, 1997, 385(2): 139－149.

（编辑 陈聪连）

（上接 960 页）

片，最后经过扫描才能转换为计算机识别的图像信息；而获取视频信息，需要使用摄像机将模拟视频信息存储在录像带中，再用专门的设备对模拟信号进行采集转换，最终获得可被计算机识别的数字视频。由此可见：① 传统摄影摄像周期长、效率低。胶卷、录像带转换为数字信号需要扫描采集过程，整个工序需要较长时间，而本方法可即刻获得图像或视频信息。② 传统的摄影、摄像在数字化时会丢失信息照片扫描、录像带采集过程中都会有信号的丢失和干扰因素，使分辨率、色彩还原性等降低，而本方法无需中间过程，信息丢失较少。③可获得传统方法不能得到的实验数据。我室采用本方法在倒置显微镜下捕获了细胞生长和变化的整个过程由于计算机技术的普及和实验的不断深入，我们需要收集大量实验数据进行分析研究，而制约其发展和最大效率发挥的因素是过程复杂且干扰因素较多，本方法的应用弥补了医学研究在采集、计算、分析方面的不足，提高了科研效率，为研究手段的更新、研究效率和准确性的提高提供支持，因此 CCD 及其相关软硬件技术将会逐步得到更为广泛的应用。

关键词：细胞；CCD；视频信息；多媒体；摄影；摄像

中图法分类号：R-331 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈卫国，洪志刚，何冬红，等. 用基因标记技术实时观察中性粒细胞吞噬病原体[J]. 中华检验医学杂志，2000, 23(3): 141－143.

[2] 陈天明，王苏生，俞 信，等. 一种数字化高灵敏度荧显微镜及其在竹红菌甲素研究中的应用[J]. 光学学报，1996, 16(8): 1157－1162.

[3] 苗振魁，王庆有，刘诗荣，等. 自动显微图像处理系统的研制[J]. 光学技术，1997, 1(1): 43－45.

（编辑 刘洪娥）

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