DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.013

肝细胞线粒体磷脂组分的增龄性改变及其机理

孙文兵 李 昆 马瑞亮 韩本立 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 630038

摘 要 目的: 探讨肝细胞线粒体磷脂组分的增龄性改变。方法: 测定了不同月龄 (6、12、18和 24月龄) 组大鼠肝细胞 (HC)线粒体磷脂及其组分、丙二醛 (MDA)、维生素 E(VE)和磷脂酶 A_2(PLA_2)水平及 VE对以上各指标的影响。结果: 各月龄组总磷脂水平无明显改变, 18和 24月龄组磷脂酰胆碱 (PC)含量明显降低, 磷脂酰乙醇胺 (PE) /PC值显著升高。18和 24月龄组 MDA和 PLA_2水平较 6月龄组明显上升, VE含量明显下降。各 VE处理组 (VEG) VE水平显著增加, 18月龄 VEG MDA和 PLA_2水平明显低于非 VGE (NVEG), 24月龄 VEG MDA和 PLA_2水平与 NVEG比较差异不显著, 各 VEG磷脂及其组分水平与 NVEG比较差异不显著, 但 18和 24月龄 VEG PE/PC较 NVEG明显增加。结论: 线粒体磷脂组分改变是 HC增龄性改变的重要特征, 与脂质过氧化反应密切相关, VE对老化 HC线粒体过度活跃的脂质过氧化反应有一定的防治作用。

关键词 线粒体, 肝; 磷脂; 丙二醛; 磷脂酶 A_2; 维生素 E

中图法分类号 R329.24

肝脏增龄性改变的特点之一是肝细胞 (HC)能量代谢紊乱[1], 其机理尚需进一步阐明。文中报道了老化 HC线粒体磷脂组分的改变, 并对其机理进行了初步探讨, 为进一步探讨肝脏增龄性改变的机理及临床防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

Wistar大鼠, 四川省中药研究所动物室提供, 雌雄不拘。按月龄分为 6、12、18和 24月龄组。将上述各组再分为维生素 E治疗组 (VE)和非维生素 E治疗组 (NVEG)。每组 5只, 共 40只。VEG采用 5% VE乳剂 (西南制药六厂)在活杀前 13周行腹腔注射给药, 每周分两次给药, 每次 500 mg/kg。NVEG行生理盐水对照。

1.2 肝脏线粒体磷脂含量测定

1.2.1 HC线粒体的制备 按文献 [2]方法进行。

1.2.2 线粒体磷脂提取 按文献 [3]方法进行, 线粒体悬液 1 ml[{C_B}(20~30) mg·ml^{-1}pro]与氯仿∶甲醇∶HCl(2∶1∶0.01, V/V)提取液 9 ml旋转混匀 1 min, 静置 15 min, 离心去蛋白及上液, 下液加 1/5体积 0.05 mol/L $CaCl_2$旋转混匀, 静置, 离心 (300 r/min×1 min), 分取下层液用 N_2吹干, -20℃保存, 分别待测总磷脂及其组分。

1.2.2.1 总磷脂测定 高氯酸消化后, 用中国科学院生物物理所生产的无机磷试剂盒测定。

1.2.2.2 几种主要磷脂组分的分析[4] 氯仿: 流动相 (1∶4, V/V)稀释液 0.2 ml溶解, 法国 Gilson公司 HPLC系统检测。条件如下: ① 分析柱: Sepharob C18(4.6×300 mm, 10 μm)中科院大连化物所; ② 紫外 203 nm进行; ③ 流动相: 乙腈∶甲醇∶85%磷酸为 250∶7∶2; ④ 进样量: 10 μl。磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰丝氨酸 (PS)及磷酸肌醇标准品均购自 Sigma公司。

1.2.3 线粒体丙二醛 (MDA)含量测定 硫代巴比妥酸反应法。

1.2.4 线粒体磷脂酶 A_2(PLA_2)含量测定 微量酸滴定法[5]。

1.2.5 线粒体 VE含量测定 参照文献 [6]荧光法进行。

1.2.6 统计学处理 用医用统计程序集 (上海科技出版社)作方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 不同月龄大鼠各处理组 HC线粒体磷脂及其组分含量

表 1中可见, 18和 24月龄 NVEG肝细胞线粒体 PC含量明显低于 6月龄组, PE/PC比值则相反。18和 24月龄 VEG肝细胞线粒体 PC和 PE/PC分别明显高于和低于 NVEG, 与 6月龄组比较差异不显著。

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

表 1　不同月龄大鼠各处理组肝细胞线粒体磷脂及其组分含量 (W_B/μg·mg^{-1}蛋白 $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 1　Mitochondrial phospholipid and its components levels of hepatocyte in different age group(W_B/μg·mg^{-1} pro, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group		Total PL	PC	PE	PS	PI	PE/PC
6 mo	NVEG	287.71±27.34	106.85±9.63	94.3±8.40	4.27±0.63	8.12±0.77	0.92±0.08
	VEG	290.43±31.27	108.39±11.27	89.49±9.71	3.96±0.39	7.89±0.91	0.86±0.06
12 mo	NVEG	283.90±24.82	104.69±8.53	96.1±8.32	4.35±0.40	8.25±0.80	0.94±0.09
	VEG	286.78±24.06	104.94±7.36	92.53±8.01	4.15±0.44	8.04±0.79	0.88±0.07
18 mo	NVEG	292.86±29.51	93.34±6.72*	101.74±9.23	4.56±0.63	8.04±0.94	1.08±0.07*
	VEG	292.80±27.92	100.39±9.29	90.18±10.12	4.03±0.29	7.69±0.83	0.89±0.09△
24 mo	NVEG	294.67±30.12	91.44±8.70*	104.89±9.81	4.72±0.53	7.55±0.74	1.15±0.09**
	VEG	289.10±29.01	98.43±8.71	94.22±10.97	4.35±0.43	7.58±0.57	0.92±0.08△△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 6 mo; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* NVEG

2.2　不同月龄大鼠各处理组 HC线粒体相关指标含量

自表 2中可见,18和 24月龄组 NVEG肝细胞线粒体 MDA PLA_2含量均明显高于 6月龄组,VE含量则相反。18月龄组 VEG肝细胞线粒体 MDA PLA_2含量均明显低于 NVEG,VE含量则相反,与 6月龄组比较差异不明显。24月龄组 VEG肝细胞线粒体 MDA含量与 NVEG比较差异不明显,仍明显高于 6月龄组;PLA_2含量明显低于 NVEG,但仍明显高于 6月龄组;VE含量明显高于 NVEG,与 6月龄组比较差异不明显。

表 2　不同月龄各处理组肝细胞线粒体相关指标含量

Tab 2　Hepatocyte mitochondrial levels of some related items in different age group($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group		MDA (W_B/nmol·mg^{-1} pro)	PLA_2(u)	VE (W_B/μg·g^{-1} pro)
6 mo	NVEG	3.1±0.39	32.48±4.11	109.81±8.32
	VEG	3.22±0.30	33.04±3.74	267.83±19.57△△
12 mo	NVEG	3.64±0.50	37.93±6.27	113.38±9.43
	VEG	3.45±0.43	32.91±4.43	277.39±21.45△△
18 mo	NVEG	4.16±0.25**	51.26±6.53**	98.70±6.81**
	VEG	3.32±0.27△△	34.93±5.35△△	246.26±26.74△△
24 mo	NVEG	4.64±0.25**	65.76±8.49**	91.67±8.43**
	VEG	4.44±0.21**	53.76±6.07**△	235.38±25.44△△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 6 mo;
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* NVEG

2.3　PE/PC与有关指标的相关性检验,见表 3。

表 3　PE/PC与有关指标的相关性检验

Tab 3　The correlation coefficient of PE/PC with some related items

log PE/PC	r	P
log MDA	0.9551	<0.05
log PLA_2	0.9899	<0.02
log VE	−0.9773	<0.05

3　讨论

对生物膜与细胞结构功能关系的研究表明,膜脂在维持细胞结构和调节其功能的过程中起重要作用,其中,磷脂是构成生物膜基本骨架的主要成份,其合理的组分是细胞和细胞器维持正常结构和功能的先决条件。研究表明,磷脂自身稳定机理的受损是老化细胞功能降低的重要原因[7]。

本结果表明,虽然增龄对大鼠肝细胞线粒体总磷脂水平无显著影响,但其组分谱发生了明显的改变,PC随月龄的增加逐渐降低,PE/PC比值逐渐升高。提示,线粒体膜 PL组分改变可能与老化大鼠肝细胞功能低下有关。近年的研究提示,线粒体膜磷脂组分改变引起功能降低的机理至少包括:① 细胞膜是以脂质为骨架的双层结构,其中嵌以功能各异的蛋白质,其周围的脂质环境的改变将影响这些蛋白质的结构和功能。② 膜磷脂组分改变可使线粒体膜流动性下降,僵硬度上升,膜通透性增加,导致线粒体结构和功能受损[8]。③ 膜脂质组分的改变,如 PC含量的降低,可使线粒体膜过氧化损伤易感性显著增加[9]。目前,老化肝细胞线粒体膜 PE/PC比值的升高导致其损伤的具体机理尚未明确。

本结果还显示,随着月龄的增加,肝细胞线粒体 MDA和 PLA_2含量逐渐增加,VE水平逐渐降低,并以 18月龄和 24月龄组最显著,这些改变与 PE/PC有明显的正相关。这再次证明,线粒体膜磷脂组分的改变与其脂质过氧化损害的增多关系密切。VE是体内有效的抗氧化剂,通过将其活泼的氢原子给予自由基,从而减轻消除自由基的损害作用,对脂质过氧化有显著的抑制作用。因此,不难推知,老化肝细胞线粒体维生素 E水平显著降低可能与活跃的过氧化反应导致维生素 E过多消耗有关。同时,由于维生素 E不能够 100%防止脂质过氧化,对已形成的过氧化脂质,则需要 PLA_2来修复、分解和清除,使其不发生积聚,以免引起线粒体损害,可见 PLA_2水平升高可能是老化 HC

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

线粒体脂质过氧化增强导致的代偿性生理反应。

考虑到机理的研究不同于治疗剂量的探讨,前者应尽量避免用量不足出现假阳性或假阴性,我们在本实验中对不同月龄组大鼠应用了大剂量维生素 E补充治疗。结果发现,各维生素 E治疗组肝细胞线粒体维生素 E含量均有显著提高,18月龄组 MDA含量与非维生素 E治疗组比较明显下降,24月龄治疗组虽有降低趋势,但差异不显著。各治疗组 PLA_2的变化规律与 MDA基本相同。各治疗组磷脂总量及组分与非维生素 E治疗组比较差异不明显,但 18和 24月龄维生素 E治疗组 PE/PC较非维生素 E治疗组明显增加。

结果提示,肝细胞线粒体磷脂组分的改变是伴随老化产生的重要病理生理事件,其原因与脂质过氧化反应关系密切,PLA_2水平的增多及维生素 E水平的下降可能是机体对脂质过氧化反应增强的代偿性改变。外源性给予维生素 E对老化肝细胞线粒体脂质过氧化反应有明显的抑制作用,而且,从维生素 E对 18月龄和 24月龄组防治结果的差异看,这种作用似乎更有助于对增龄性脂质过氧化反应的预防,其具体机制尚待进一步探讨。

参考文献

1 孙文兵,韩本立,李 昆等.老化大鼠急性部分肝胆管梗阻感染时肝细胞腺苷酸代谢增龄指标变化的实验研究.中国老年学杂志, 1996; 16(2): 99

2 孙文兵,韩本立,李 昆等.钙离子通道阻滞剂对急性胆道感染时肝细胞能量受损的保护作用.中华实验外科杂志, 1993; 10(5): 214

3 Higgins J A. Separation and analysis of membrane lipid components. In: Findlay JBC, eds, Biological membrane: a practical approch. Oxford, Washington D C: IRC Press, 1987: 103-105

4 汤习锋,康格非,曾成鸣.高效液相色谱分析生物膜磷脂.生物化学与生物物理进展, 1993; 20(5): 399

5 陈思锋,吴中立.体液和组织磷脂酶 A_2简便加速测定法.第二军医大学学报, 1989; 10(3): 535

6 侯力范,朱振源.生物材料中生育酚的荧光测定法.分析化学, 1982; 10(9): 535

7 Bock G, Huber, L A, Wick G *et al*. Use of a FACSIII for flurescence depolarization with DPH. Histochem Cytochem, 1989; 37(11): 1653

8 Laganiere S, Yu B P. Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restrication. Gerontology, 1993; 39(1): 7

9 Shigenaga M K, Hager T M, Ames B N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91(23): 10771

(收稿: 1996-05-11;修回: 1997-01-24)

(编辑 刘 鹏)

Age-related changes of the composition of hepatocytic mitochondrial phospholipids and its mechanism

Sun Wenbing, Li Kun, Ma Ruiliang, Han Benli (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To investigate the age-related changes of the composition of hepatocytic mitochondrial phospholipids and its mechanism. Methods: The levels of hepatocytic mitochondrial phospholipid(VE) and its composition, malondialdehyde (MDA), vitamin E (VE) and phospholipidase A2 (PLA2) were measured and the effects of VE pretreatment on the above-mentioned indices determined in rats of various ages (6 mo, 12mo, 18mo and 24mo). Results: There was no significant difference among the total PL levels of the four groups, but the contents of phosphoatidylcholine (PC) of the 18 mo and 24 mo groups were significantly lower than that of the 6 mo group and phosphoatidylethanolamine (PE)/PC ratio was significantly increased. There were significant increase of MDA and PLA2 levels and decrease of VE level in the 18 mo and 24 mo groups and the 4 VE pretreated groups (VEGs) had evidently higher VE contents. The MDA and PLA2 contents were significantly lower in VEG of 18 mo than in non-VE pretreated groups (NVEGs). As for levels of total PL and its composition, there was no significant difference between VEGs and NVEGs. However, the PE/PC ratios of the 18 mo and 24 mo VEGs were significantly higher than those of NVEGs. Conclusion: The altered PL composition, which is closely related to oxidative damage, plays an important role in the hepatocytic mitochondrial decay in aging. VE is effective only to some degree in inhibiting the oxidative damage induced by the altered PL composition.

Key words aging; hepatocytic mitochondrial phospholipid; malondialdehyde; phospholipidase A2; vitamin E

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