

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.005

小鼠脑组织细胞色素 C 氧化酶活性、线粒体细胞色素含量与年龄关系

朱宏亮, 万立华

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的: 研究小鼠脑组织细胞色素 C 氧化酶(Cytochrome C oxidase, CCO)活性、线粒体细胞色素 C(Cytochrome C, Cyt C)含量与年龄的关系, 为法医学年龄推断提供新的思路。方法: 利用紫外分光光度法检测了 1、3、6、9、12 月龄昆明小鼠的脑组织 CCO 活性及线粒体 Cyt C 含量。结果: 小鼠脑组织 CCO 活性、线粒体 Cyt C 含量, 随着年龄增大而逐渐降低。结论: 脑组织 CCO 活性及线粒体 Cyt C 含量有望用于年龄推断。

【关键词】细胞色素 C 氧化酶; 细胞色素 C; 线粒体; 年龄推断

【中国图书分类法分类号】R89

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-28

Relationship among CCO activity, contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues and mice age

ZHU Hongliang, WAN Lihua

(Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To provide new ideas for forensic age estimation by studying relationship among cytochrome C oxidase (CCO) activity, contents of cytochrome C (Cyt C) in mitochondria of brain tissues and mice age. Methods: CCO activity and contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues of 1, 3, 6, 9, 12 months old Kunming mice were detected using UV spectrophotometry. Results: CCO activity and contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues were decreased gradually with the increase of mice age. Conclusion: CCO activity and contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues may be used for age estimation.

【Key words】cytochrome C oxidase; cytochrome C; mitochondria; age estimation

近年来随着经济的发展, 人口流动越来越频繁, 群体性灾难事件(地震、空难、火车碰撞等)时有发生, 这些导致法医学领域身份不明的尸体不断增多。对身份不明的尸体进行年龄推断一直是法医学中需要解决的最重要的问题之一。目前法医学年龄推断广泛使用的方法主要有根据人类学中骨骼与牙齿磨损程度以及根据影像学中的骨骺愈合程度推断年龄。这两种方法虽然比较经典, 但由于种族、民族、饮食习惯等方面的不同, 推断的结果误差也相对较大, 特别是在软组织或斑痕检材(血痕、精斑等)中无法应用^[1]。分子生物学方法的应用, 可能解决软组织或斑痕检材年龄推断的难题。目前对于年龄推断研究比较多的分子生物学方法主要有根据天冬氨酸外消旋、晚期糖化终末产物、DNA 片段缺失、端粒 DNA 长度、DNA 甲基化等推断年龄, 这些

方法操作比较复杂, 且对仪器的要求比较高, 价格比较昂贵。所以这些年龄推断的方法尚不能完全满足实际检案的需要。积极的探索新的个体年龄推断的方法成为法医学研究者的追求。

国外报道^[2-4], 线粒体酶呼吸活性会随衰老而变化, 这就提示线粒体酶呼吸活性可能与年龄存在着相关性。同时大量研究已证实细胞凋亡与衰老有着密切的联系, 而细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt C) 在细胞凋亡中起关键作用, 这也提示线粒体 Cyt C 含量可能与年龄也存在着相关性。本实验通过研究小鼠脑组织细胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome C oxidase, CCO) 活性、线粒体 Cyt C 含量与年龄的关系, 尝试为法医学年龄推断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由重庆医科大学动物中心提供的健康昆明种小鼠按照

作者介绍: 朱宏亮 (1986-), 男, 硕士,

研究方向: 法医学病理学。

通信作者: 万立华, 男, 教授, Email: ccfw@cqmu.com。

月龄分为:1 月龄组 12 只,体重(15 ± 2) g;3 月龄组 12 只,体重(24 ± 3) g;6 月龄组 12 只,体重(35 ± 5) g;9 月龄组 12 只,体重(40 ± 5) g;12 月龄组 12 只,体重(45 ± 5) g,每组雌雄各半。

1.2 实验方法

1.2.1 样本组织制备 (1)用颈椎脱臼法处死小鼠,提取脑组织。取脑组织 0.150 g 加入预冷的分离介质(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L KCl, 0.25 mol/L 蔗糖),用电动匀浆机 6 000 r/min, 5 min, 制成 10% 脑组织匀浆(主要操作均在冰面上进行)。(2)取脑组织匀浆液低温离心(3 500 g/min) 15 min, 取上清液(用于 CCO 活性测定)。(3)取脑组织匀浆液低温离心(600 g/min) 15 min, 除去细胞碎片、细胞核等, 取上清液低温离心(18 000 g/min) 15 min, 弃上清, 加入缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L KCl, 0.25 mol/L 蔗糖), 制成脑组织线粒体悬液(用于脑组织线粒体 Cyt C 含量测定)。

1.2.2 脑组织 CCO 活性测定 取 0.18 mmol/L Cyt C 0.5 ml, 加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4) 2.4 ml 和少量连二亚硫酸钠、摇匀, 用 UV7504 紫外可见分光光度计在 550 nm 波长下测得 A_0 值, 然后加入脑组织匀浆液(经离心后的上清液) 0.1 ml 及破膜剂 30 μ l, 立即开始计时, 随后每隔 30 s 测定 1 次 A 值, 持续测定 3 min, 最后加入饱和高铁氰化钾溶液 1 滴, 使之完全氧化并记录结果。计算每克脑组织每分钟氧化 Cyt C 的速率来代表 CCO 的活力。

1.2.3 脑组织线粒体 Cyt C 含量测定 使用张均田法^[9]。标准曲线测定:取 0.18 mmol/L Cyt C 标准液 3 ml 稀释至 30 ml, 然后分别取稀释液 2、4、6、8、10 ml 放于试管中, 加蒸馏水至 15 ml, 每管加少许连二亚硫酸钠, 520 nm 处测定光密度。以水作为空白对照, 以标准品的浓度为横坐标, 光密度为纵坐标, 绘制标准曲线作为定量依据。取所得的线粒体悬液超声破碎仪破碎 3 次以破坏线粒体膜。然后取线粒体悬液 1.5 ml, 加入少许连二亚硫酸钠、摇匀, 520 nm 处测定光密度, 根据所得标准曲线计算其浓度。

1.3 统计学处理

实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各年龄组间的差异比较用单因素方差分析。

2 结果

各年龄组脑组织 CCO 活性结果及各年龄组脑组织线粒体 Cyt C 含量结果见表 1。用 SPSS 17.0 统计软件, 采取方差分析, $P < 0.05$, 再经 LSD 两两比较, 相邻组间均 $P < 0.05$, 相隔组间均 $P < 0.05$, 各组间差异均有统计学意义。脑组织 CCO

活性与小鼠月龄的关系见图 1。脑组织线粒体 Cyt C 含量与小鼠月龄的关系见图 2。

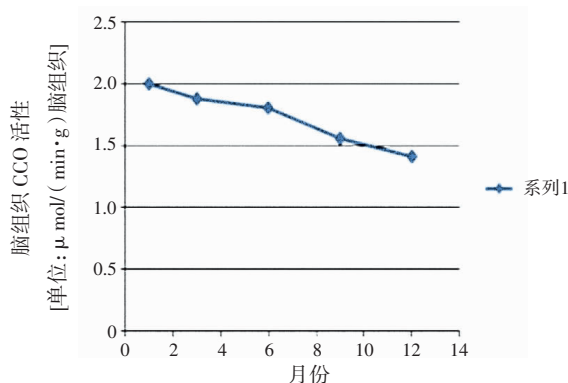


图 1 脑组织 CCO 活性与小鼠月龄的关系

Fig.1 Relationship between CCO activity of brain tissues and mice age

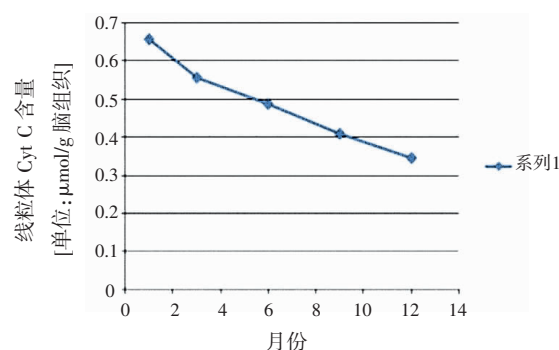


图 2 脑组织线粒体 Cyt C 含量与月龄的关系

Fig.2 Relationship between contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues and mice age

3 讨论

CCO 是线粒体呼吸链的终端酶, 是呼吸电子传递链的第 4 个中心酶复合物, 是细胞的有氧代谢和氧化磷酸化偶联的关键酶之一。研究表明衰老的一个表征^[6,7]就是线粒体 DNA 突变与衰老之间存在着相关性。线粒体 DNA 缺少组蛋白的保护, 而且常常暴露在氧化应激状态下, 而氧化应激状态以及产生的氧化物质都会损伤线粒体 DNA, 而这种损伤随着年龄的增长积累, 就会导致线粒体 DNA 突变。线粒体 DNA 突变(损伤), 会引起其编码的有关酶的活性改变^[7], 当然也包括导致 CCO 活性的降低^[2-4]。

表 1 各年龄组的小鼠脑组织 CCO 活性及小鼠脑组织线粒体 Cyt C 含量[单位: $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 脑组织]

Tab.1 CCO activity of brain tissues and contents of Cyt C in mitochondria of brain tissues among diffident age groups (unit: $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ brain tissue)

	1月龄	3月龄	6月龄	9月龄	12月龄
CCO活性	2.000 $\pm$ 0.085	1.880 $\pm$ 0.053	1.810 $\pm$ 0.062	1.560 $\pm$ 0.098	1.410 $\pm$ 0.084
Cyt C 含量	0.657 $\pm$ 0.038	0.557 $\pm$ 0.050	0.488 $\pm$ 0.045	0.408 $\pm$ 0.036	0.346 $\pm$ 0.037

本研究只是发现 CCO 活性下降与年龄有相关性,但是以前许多研究^[9,10]表明 CCO 活性下降与呼吸链被阻断有关,在法医学领域的研究最多的就是氰化物中毒。这表明 CCO 活性除了与年龄相关外还受到氰化物中毒等的影响,如果其用于年龄推断需要排除氰化物中毒等呼吸链被阻断的影响,甚至可能这个对 CCO 活性的影响要比年龄对 CCO 活性的影响大,这个需要进一步的研究。

大量研究已证实细胞凋亡与衰老有着密切的联系。细胞凋亡参与多种与衰老相关的病理过程^[11],而更有一些学者认为衰老细胞的死亡实质就是细胞凋亡^[12,13]。而且细胞代谢障碍是老化产生的促发因素^[14]。Cyt C 不仅有控制细胞能量代谢,而且线粒体 Cyt C 是内源性途径启动凋亡由线粒体向胞浆所释放的关键的凋亡相关因子之一^[15]。现已有很多的实验表明:线粒体 Cyt C 的释放在内源性途径的细胞凋亡过程中占有核心地位^[15-17]。随着年龄增长,内源性凋亡途径逐渐变得活跃^[11]。每次内源性凋亡的启动必然伴随有线粒体向胞浆释放 Cyt C。而正常情况下,Cyt C 是一个水溶性蛋白质,相对分子量为 1.45×10^4 Da,定位于线粒体膜间隙,其与线粒体内膜结合较为稳定,是不能够通过线粒体外膜的^[18,19]。而伴随着线粒体 Cyt C 的释放,就会有线粒体 Cyt C 含量的降低。随着年龄的增长,内源性凋亡途径变得活跃,线粒体 Cyt C 的释放增多,则会有相应组织线粒体 Cyt C 含量的降低。

本次实验通过紫外分光光度法以及过张均田法分别测定小鼠脑组织 CCO 活性以及脑组织线粒体 Cyt C 含量,发现二者随着年龄增大而逐渐降低,且各年龄组差异性具有统计学意义,认为脑组织 CCO 活性及脑组织线粒体 Cyt C 含量将来可能成为法医学年龄推断的新指标之一,而且最重要的是与前面提到年龄推断方法相比较,这两个指标的测量方法比较简单,一般实验室就能满足条件,有利于推广。本次实验因为考虑到小鼠出生阶段可能存在各项机能还不稳定的状况,而本次试验的目的主要是为进行法医学年龄推断新方法的初步研究,所以选取小鼠年龄段不是从刚出生开始,而是选择从 1 月龄开始。

参 考 文 献

- [1] 台运春,陆惠玲.分子生物学方法推断年龄的研究进展[J].中国法医学杂志,2004,19(6):383-384.
- Tai Y C, Lu H L. Advances in age estimation with methods of molecular biology[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2004, 19(6): 383-384.
- [2] Kwong L K, Sohal R S. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 373(1): 16-22.
- [3] Martinez M, Hernandez A I, Martinez N. Age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria[J]. Brain Res, 1996, 731(1-2): 246-248.
- [4] Desai V G, Weindruch R, Hart R W. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 333(1): 145-151.
- [5] 张均田,主编,现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998,1228-1229.
- Zhang J T. Modern experimental methods in pharmacology[M]. Beijing: Beijing Medical University Peking Union Medical College Press Association, 1998, 1228-1229.
- [6] Wallace D C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and aging[J]. Novartis Found Symp, 2001, 235: 247-263.
- [7] 王学波,李建远.线粒体 DNA 突变与衰老[J].中外医学研究, 2011, 9(18): 160-161.
- Wang X B, Li J Y. Mitochondrial DNA mutations associated with aging[J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2011, 9(18): 160-161.
- [8] 邱小忠,陈 媛,周 玫,等.安定导致小鼠大脑的线粒体氧化应激损伤[J].第一军医大学学报,2001,21(4): 279-281.
- Qiu X Z, Chen Y, Zhou M, et al. Brain mitochondrial oxidative injuries induced by diazepam in mouse[J]. Journal of First Military Medical University, 2001, 21(4): 279-281.
- [9] 王明军.氰化物中毒的生化机理[J].黔南民族师范学院学报, 2008, (3): 75-77.
- Wang M J. Biochemical mechanism of the cyanide poisoning[J]. Journal of Qiannan University of Nationalities, 2008, (3): 75-77.
- [10] 赵 杰,朱明学,马 骞,等.氰化氢复合中毒对大鼠血中氰离子和细胞色素氧化酶活力的影响[J].毒理学杂志,2006,20(3): 174-175.
- Zhao J, Zhu M X, Ma Q, et al. The impact of hydrogen cyanide poisoning on the cyanide ions and cytochrome oxidase activity in rat blood[J]. Journal of Toxicology, 2006, 20(3): 174-175.
- [11] 王怀颖,郝岩君,苏 佳.细胞凋亡与衰老[J].中国老年学杂志, 2009, (10): 1315-1317.
- Wang H Y, Hao Y J, Su J. Cell apoptosis and aging[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2009, (10): 1315-1317.
- [12] 惠宏襄,赵小宁,金 明,等.自由基与细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(1): 12-16.
- Hui H X, Zhao X N, Jin M, et al. Free radicals and apoptosis[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1996, 23(1): 12-16.
- [13] 王新玲,李月彩,侯颖春.自由基、细胞凋亡与衰老关系的研究进展[J].中国老年学杂志,1999,19(4): 252-253.
- Wang X L, Li Y C, Hou Y C. Research progress of the relationship between free radicals, apoptosis and aging[J]. Chinese Journal of Gerontology, 1999, 19(4): 252-253.

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.006

肝 X 受体激动剂 T0901317 对缺氧复氧损伤人脐静脉内皮细胞的保护及机制研究

周 敏, 李法琦

(重庆医科大学附属第一医院老年病科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨肝 X 受体激动剂 T0901317 激活肝 X 受体对人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)缺氧复氧(Anoxia/reoxygenation, A/R)损伤的影响及其可能机制。方法:传代培养 HUVECs, 建立 A/R 模型, 实验分为 6 组:正常对照组, 单纯缺氧(Anoxia, AN)组, 缺氧复氧(A/R)组, A/R+入不同浓度(0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)肝 X 受体激动剂 T0901317 干预组(A/R+T 0.1 组、A/R+T 1 组+A/R+T 10 组)。流式细胞术检测各组细胞凋亡率;RT-PCR 方法检测各组细胞间黏附分子-1 (Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)mRNA 表达;凝胶电泳迁移率分析法检测各组核转录因子- κB (Nuclear factor- κB , NF- κB)的活性。结果:与正常对照组比较, 单纯缺氧组、缺氧复氧组的细胞凋亡率升高, ICAM-1、IL-6 mRNA 的表达增高, NF- κB 活性增强($P<0.05$)。与 A/R 组比较, A/R+T 0.1, A/R+T 1 组显著抑制 A/R 损伤引起的细胞凋亡, 减少炎症因子 ICAM-1、IL-6 mRNA 的表达, 并明显抑制 A/R 损伤造成的 NF- κB 活化($P<0.05$)。与 A/R+T 0.1 组比较, A/R+T 1 组细胞凋亡率, ICAM-1、IL-6 的表达及 NF- κB 活性均降低($P<0.05$)。结论:适当剂量(0.1、1 $\mu\text{mol/L}$)T0901317 可激活 HUVECs 肝 X 受体, 对 A/R 引起的 HUVECs 损伤起保护作用, 其机制可能与抑制 NF- κB 转录活性从而下调 NF- κB 通路下游炎症因子如 ICAM-1、IL-6 的表达有关。

【关键词】肝 X 受体;缺氧复氧损伤;人脐静脉内皮细胞;核转录因子- κB **【中国图书分类法分类号】**R318.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-05-03

Effects and mechanisms of LXRs agonist T0901317 on human umbilical vein endothelial cells injury induced by anoxia/reoxygenation

ZHOU Min, LI Faqi

(Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects and mechanisms of liver X receptors (LXRs) agonist T0901317 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by anoxia/reoxygenation (A/R). **Methods:** HUVECs were cultivated and divided into 6 groups randomly: normal control group, anoxia (AN) group, A/R group, A/R groups with different concentrations of T0901317 (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$; A/R+T 0.1 group, A/R+T 1 group, A/R+T10 group). The apoptosis rate of HUVECs was detected by flow cytometry. The

作者介绍:周 敏(1984-),女,硕士,

研究方向:老年医学心血管方向。

通信作者:李法琦,男,教授,Email:faqili_2006@yahoo.com.cn。

[14] 李玉林.病理学[M].第6版.北京:人民卫生出版社,2004:24.

Li Y L.Pathology[M].6th ed.Beijing:People's Medical Publishing House, 2004:24.

[15] 蔡 黔.线粒体在细胞凋亡中的作用研究进展[J].西北国防医学杂志,2002,23(5):367-369.

Cai Q.Research progress on the function of mitochondria in cell apoptosis[J].Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China, 2002,23(5):367-369.

[16] Volbracht C,Leist M,Kolb S A.Apoptosis in caspase-inhibited neurons[J].Mol Med,2001,7(1):36-48.

[17] Knoblach S M,Nikolaeva M,Hung X.Multiple caspases are activated after traumatic brain injury:evidence for involvement in function-

al outcome.[J].J Neurotrauma,2002,19(10):1155-1170.

[18] 张文华,周 璐,徐淑军,等.Caspase-3 激活和细胞色素 C 释放在脑缺血再灌注损伤中的作用[J].山东大学学报(医学版),2007,45(12):1193-1194.

Zhang W H,Zhou L,Xu S J,et al.Effects of caspase-3 activation and cytochrome C release in cerebral ischemia reperfusion injury[J].Journal of Shandong University (Health Sciences),2007,45(12):1193-1194.

[19] 冯 妍.胎膜早破与细胞凋亡的相关性研究[D].呼和浩特:内蒙古医学院,2007.

Feng Y.Correlative study on premature rupture of fetal membranes and apoptosis[D].Hohhot:Inner Mongolia Medical College,2007.

(责任编辑:唐秋姗)