

梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体 DNA 损伤的定量研究

唐 春, 别 平*, 李 昆, 张玉君, 马正伟

(第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所, 重庆 400038)

[摘要] **目的:**对梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体 DNA 损伤进行定量研究,探讨其与线粒体功能损伤的关系。**方法:**48 只健康 Wistar 大鼠随机分为假手术组和梗阻性黄疸组,梗阻性黄疸组用胆总管双重结扎并切断制成胆道梗阻模型。Estabrook 氧电极法测定线粒体呼吸控制率(RCR)和磷氧比值、Kimmich 法测定肝组织内 ATP 含量以评价肝细胞线粒体功能,并利用荧光定量 PCR 方法,对各组大鼠肝细胞总 mtDNA、缺失型 mtDNA 进行相对定量检测。**结果:**相对于假手术组,梗阻性黄疸组 RCR、磷氧比值及肝组织 ATP 含量明显减少($P < 0.01$),细胞内总 mtDNA 拷贝数减少($P < 0.01$);假手术组内未检测出缺失型 mtDNA,梗阻性黄疸组存在着缺失型 mtDNA;随着梗阻时间的延长,梗阻性黄疸组 RCR、磷氧比值及肝组织 ATP 含量逐步降低,总 mtDNA 拷贝数逐步减少($P < 0.01$),缺失型 mtDNA 在总 mtDNA 中的百分比逐步增加($P < 0.01$),其变化与线粒体功能损害相一致。**结论:**大鼠梗阻性黄疸肝细胞 mtDNA 损伤是导致线粒体功能损伤的重要因素。

[关键词] 黄疸,阻塞性;肝细胞;DNA,线粒体

[中图分类号] R 575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0048-05

Quantitative study of hepatocyte mtDNA damage in rats with obstructive jaundice

TANG Chun, BIE Ping*, LI Kun, ZHANG Yu-jun, MA Zheng-wei (PLA Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To quantitatively study the damage of hepatocyte mtDNA in rats with obstructive jaundice and to understand its relationship with the damage of mitochondrial function. **Methods:** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into 2 groups, namely, sham-operation group and obstructive jaundice group (model group). The obstructive jaundice model was induced by double ligation and section of the common bile duct. The changes of mitochondrial function were routinely assessed; the whole mtDNA and deleted mtDNA in hepatocytes were determined by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results:** Compared with sham-operation group, model group had reduced mitochondrial function and mtDNA copies ($P < 0.01$). The deleted mtDNA was found in the model group but not in the sham-operation group. With the continuation of the obstruction time, mtDNA copies decreased in the model group and the percentage of deleted mtDNA in the whole mtDNA copies increased ($P < 0.01$), which was consistent to the deterioration of mitochondrial function. **Conclusion:** The damage of hepatocyte mtDNA is an important factor for the damage of mitochondrial function in rats with obstructive jaundice.

[KEY WORDS] jaundice, obstructive; hepatocytes; DNA, mitochondrial

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1):48-52]

梗阻性黄疸是临床上一种常见疾病,多由结石及肿瘤引起。胆道梗阻后由于正常的胆汁排泄受阻,引起胆汁酸在肝细胞内淤积,胆汁酸对肝细胞内的线粒体结构和功能有明显损害作用。线粒体是梗阻性黄疸时肝细胞内最先受损害的细胞器^[1],而线粒体功能是决定肝细胞功能的重要因素^[2]。对于梗阻性黄疸引起线粒体形态和功能改变的具体机制,目前有许多学者进行了有益的探索,但对于影响线粒体功能最基本的因素,即线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的变化情况,目前国内外并无相关文献报道。在先前的实验中,我们利用大片段 PCR (long and accurate PCR, LA-PCR) 结合限制性酶切分析及基因测序方法,发现梗阻性黄疸大鼠肝

细胞 mtDNA 存在着在 4 101~15 294 碱基之间大约 11 194 bp 的片段缺失。但一个细胞中往往有上百个线粒体,而每个线粒体内大约有 2~10 个拷贝的 mtDNA, mtDNA 的损伤数目需达到某种程度才足以引起某器官或组织的功能异常。为此,我们利用荧光定量 PCR 方法,对梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体 DNA 的损伤情况进行了定量研究,并探讨其与线粒体功能损伤的关系。

[基金项目] 国家自然科学基金(30571806)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571806)。

[作者简介] 唐 春,博士,主治医师。

E-mail: tangchun73@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: bieping@mail.tmmu.com.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物模型制作及分组 健康 Wistar 大鼠(由第三军医大学实验动物中心提供)雌雄不限,体重 175~330 g,平均(214.94±32.33) g。随机分为 2 组:假手术组,开腹后暴露肝门,游离胆总管后关腹;梗阻性黄疸组,胆总管中上 1/3 行胆总管双重结扎,术后 6~12 h 观察大鼠小便颜色变黄即说明胆道梗阻性黄疸模型建立成功^[3]。

所有实验动物术前禁食水 12 h,麻醉采用乙醚吸入麻醉,术后自由进食水。各组观察时相点为术后 1、4、7、14 d,保证每时相点存活大鼠 6 只。

1.2 线粒体功能检测 采用线粒体呼吸控制率(respiratory control ratio, RCR)、磷氧比值以及肝组织 ATP 含量作为线粒体功能指标。分别以 Estabrook 氧电极法^[4]测定线粒体 RCR 和磷氧比值以及 Kimmich 方法^[5]测定肝组织内 ATP 含量。

1.3 肝细胞 mtDNA 损伤的定量检测 采用荧光定量 PCR 方法,对大鼠梗阻性黄疸肝细胞缺失型 mtDNA 及总 mtDNA 拷贝数进行相对定量检测。组织总 DNA 提取试剂盒购自北京天为时代公司,荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex Taq[™])购自大连宝生物公司。

1.3.1 PCR 引物 缺失型 mtDNA 引物:上游引物

P₁(碱基序列 3 878~3 900), 5'-CCC TTC CCG TAC TAA TAA ATC CA-3'; 下游引物 P₂(碱基序列 15 668~15 690), 5'-GTT GAT TTC ACG GAG GAT GGT AG-3'。引物位于大鼠梗阻性黄疸肝细胞 mtDNA^[11194] 缺失片段两侧,对于正常的 mtDNA,因较短的延伸时间不足以合成较长的 DNA 片段,对于缺失型 mtDNA 则可合成 617 bp 片段。

总 mtDNA(ND1)引物:上游引物 P₁(碱基序列 2 813~2 834), 5'-GGC TAC ATA CAA TTA CGC AAA G-3'; 下游引物 P₂(碱基序列 3 058~3 079), 5'-TAG AAT GGA GTA GAC CGA AAG G-3'; 扩增片段长度 267 bp。因 ND1 片段为 mtDNA 高度保守序列,故其可以反映 DNA 模板中 mtDNA 的总量。

β -actin 引物:上游引物 P₁(碱基序列 2 747~2 771), 5'-ATC CGT AAA GAC CTC TAT GCC AAC A-3'; 下游引物 P₂(碱基序列 2 900~2 923), 5'-GGC TAC AAC TAC AGG GCT GAC CAC-3'; 扩增片段长度 177 bp。

1.3.2 PCR PCR 体系为 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μ l, DNA 模板 2 μ l(约 100 ng), 上下游引物各 0.4 μ l(终浓度 0.2 μ mol/L), H₂O 7.2 μ l; 总反应体积 20 μ l。采用 Roche Lightcycler 荧光定量 PCR 仪,具体反应条件见表 1。

表 1 大鼠梗阻性黄疸 mtDNA 变化情况荧光定量 PCR 反应条件

Tab 1 Conditions of fluorescent quantitative PCR in determination of mtDNA in obstructive jaundice rats

Product	Condition of fluorescent quantitative PCR								
	Stage 1; force-degeneration (1 cycle)			Stage 2; PCR(45 cycles)			Stage 3; dilapsus curve		
	TTp	TTm	TTR	TTp	TTm	TTR	TTp	TTm	TTR
Total mtDNA (ND1)	95	60	20	95	10	20	95	0	20
				55	20	20	65	15	20
				72	15	20	95	0	0.1
Deleted mtDNA	95	60	20	95	10	20	95	0	20
				55	30	20	65	15	20
				72	60	20	95	0	0.1
β -actin	95	60	20	95	10	20	95	0	20
				55	20	20	65	15	20
				72	15	20	95	0	0.1

TTp: Target temperature (T/°C); TTm: Incubation time(t/s); TTR: Temperature transition rate(°C/s)

1.3.3 标准曲线 分别取正常大鼠总 DNA 制作总 mtDNA(ND1)与 β -actin 的标准曲线,取肝功能损害最严重的梗阻后 14 d 大鼠总 DNA 制作缺失型

mtDNA 标准曲线。各反应模板按 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ 倍比稀释。

1.3.4 定量计算 根据标准曲线计算出各模板的

底物浓度,然后以缺失型 mtDNA 与总 mtDNA 的比值作为缺失型 mtDNA 在肝细胞中的相对定量,以总 mtDNA 与 β -actin 的比值作为肝细胞总 mtDNA 拷贝数的相对定量。

1.4 统计学处理 本实验采用 SPSS 12.0 for Windows 统计软件进行统计分析。统计资料表达采用 $\bar{x} \pm s$ 方式,采用 t 检验。

2 结果

2.1 肝细胞线粒体功能检测结果 梗阻性黄疸组大鼠胆总管结扎后,线粒体功能出现明显损害,具体表现为 RCR、磷氧比值及肝组织 ATP 含量与同时相点假手术组相比明显减少 ($P < 0.01$),同时随着梗阻时间的延长而逐步降低 ($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 大鼠梗阻性黄疸肝细胞线粒体功能变化情况

Tab 2 Changes of hepatocyte mitochondrial function in obstructive jaundice rats

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Time(t/d)	RCR	P/O	ATP(μ moles/g)
Sham-operation	1	4.03 \pm 0.09	1.73 \pm 0.06	2.99 \pm 0.10
	4	4.03 \pm 0.09	1.73 \pm 0.05	3.05 \pm 0.06
	7	4.05 \pm 0.11	1.75 \pm 0.05	3.02 \pm 0.10
	14	4.02 \pm 0.11	1.74 \pm 0.04	3.03 \pm 0.11
Obstructive jaundice	1	3.30 \pm 0.15** $\Delta\Delta$	1.43 \pm 0.04** $\Delta\Delta$	2.21 \pm 0.13** $\Delta\Delta$
	4	3.06 \pm 0.11** $\Delta\Delta$	1.36 \pm 0.04** $\Delta\Delta$	1.88 \pm 0.05** $\Delta\Delta$
	7	2.70 \pm 0.17** $\Delta\Delta$	1.23 \pm 0.03** $\Delta\Delta$	1.34 \pm 0.10** $\Delta\Delta$
	14	2.13 \pm 0.14** $\Delta\Delta$	0.98 \pm 0.05** $\Delta\Delta$	0.46 \pm 0.07** $\Delta\Delta$

RCR: Respiratory control ratio. ** $P < 0.01$ vs sham-operation group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs different time points in obstructive jaundice group

2.2 荧光定量 PCR 标准曲线及融解曲线 各反应产物标准曲线线性关系良好(图 1A、2A、3A);另在制作缺失型 mtDNA 标准曲线时,当按 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 倍比稀释反应模板时,在 10^1 及 10^0 浓度中未见阳性产物,故取前 4 种浓度制作标准曲线,分别按 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 浓度计算;在制作 β -actin 标准曲线时,当按 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 倍比稀释反应模板时,在 10^0 浓度中未见阳性产物,故取前 5 种浓度制作标准曲线,分别按 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 浓度计算。融解曲线分析,扩增目的产物正确(图 1B、2B、3B)。

2.3 肝细胞 mtDNA 损伤的定量检测结果 梗阻性黄疸组大鼠胆道梗阻后,总 mtDNA 拷贝数出现明显下降,与同时相点假手术组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),并随着梗阻时间的延长逐步下降 ($P < 0.01$)。对于缺失型 mtDNA 占总 mtDNA 的百分比,在假手术组,未检测出缺失型 mtDNA;而在梗阻性黄疸组,各时相点均可见缺失型 mtDNA,其与总 mtDNA 的百分比随着梗阻时间的延长而逐步增加 ($P < 0.01$)。见表 3。

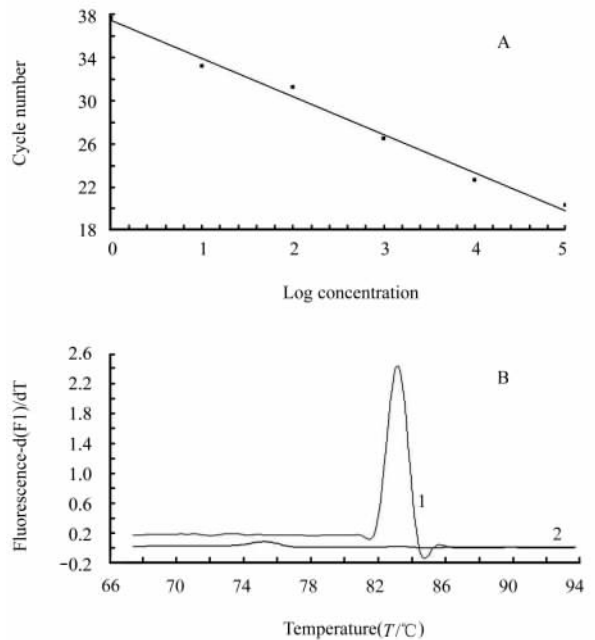


图 1 总 mtDNA(ND1) 荧光定量 PCR 标准曲线及融解曲线

Fig 1 Standard curve and dissociation curve of FQ-PCR of total mtDNA

A: Standard curve; B: Dissociation curve. 1: Product; 2: Negative control

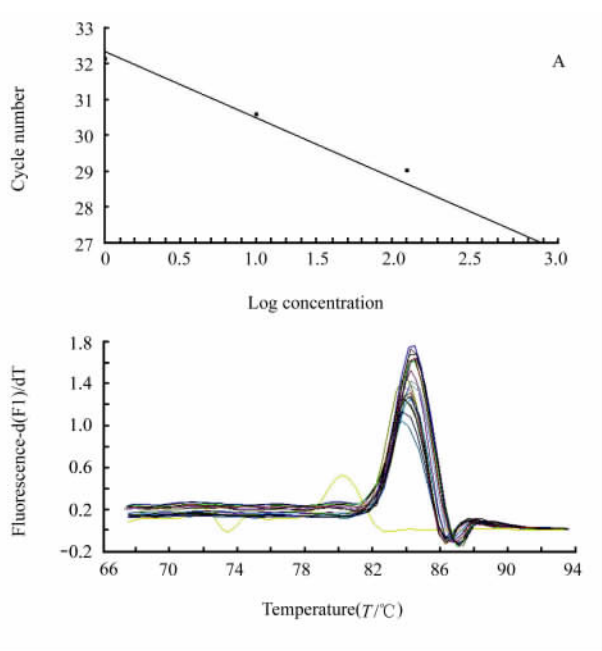


图 2 缺失型 mtDNA 荧光定量 PCR 标准曲线及融解曲线

Fig 2 Standard curve and dissociation curve of FQ-PCR of deleted mtDNA

A: Standard curve; B: Dissociation curve. Green indicates product and blue indicates negative control

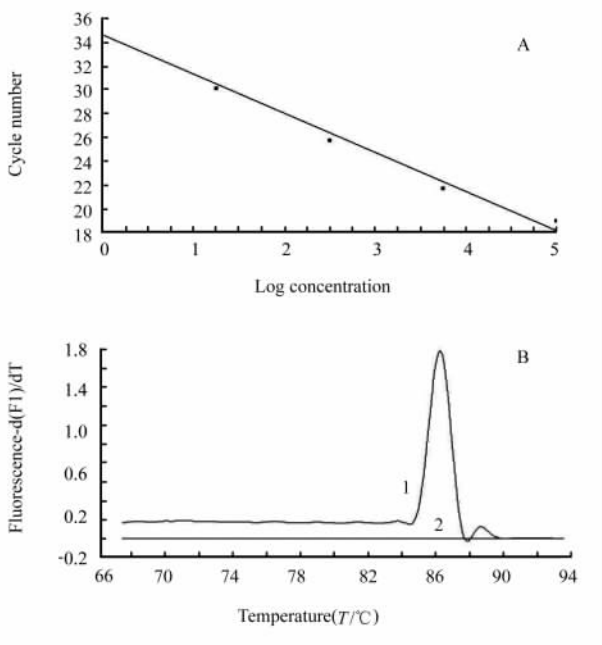


图 3 β -actin 荧光定量 PCR 标准曲线及融解曲线

Fig 3 Standard curve and dissociation curve of FQ-PCR of β -actin

A: Standard curve; B: Dissociation curve. 1: Product; 2: Negative control

表 3 大鼠梗阻性黄疸肝细胞 mtDNA 变化情况

Tab 3 Quantitative changes of hepatocyte mtDNA in obstructive jaundice rats

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time(t/d)	Total mtDNA (ND1)	Deleted mtDNA(%)
Sham-operation	1	4.39±0.54	—
	4	4.67±0.44	—
	7	4.69±0.73	—
Obstructive jaundice	14	4.31±0.51	—
	1	2.50±0.61* $\Delta\Delta$	4.44±1.47 $\Delta\Delta$
	4	2.15±0.33* $\Delta\Delta$	11.19±3.31 $\Delta\Delta$
	7	1.64±0.30* $\Delta\Delta$	19.64±3.03 $\Delta\Delta$
	14	1.16±0.33* $\Delta\Delta$	30.24±3.85 $\Delta\Delta$

** P<0.01 vs sham-operation group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs different time points in obstructive jaundice group

3 讨论

梗阻性黄疸是临床上一常见疾病,了解梗阻性黄疸肝功能的损害机制,对如何保护及改善梗阻性黄疸的肝功能具有重要意义。目前已有广大学者对之进行了研究,但对梗阻性黄疸肝细胞线粒体功能及影响线粒体功能的 mtDNA 研究较少。

mtDNA 是核外惟一具有遗传效应的物质,作为一种结构相对简单而精致的真核生物基因组,编码了 2 个 rRNA, 22 个 tRNA 以及 13 个与氧化磷酸化有关的多肽(主要有 cytC 氧化酶 I、II、III 亚基, ATP 酶复合体 6、8 亚基, cytbc 复合体亚基以及 NADH 的 7 个亚基)。mtDNA 非编码控制区(control region)包括 HV 区(hypervariable region)、D-loop 区及复制转录区,此外,mtDNA 各基因之间很少有非编码碱基的存在。mtDNA 的基因结构全部是外显子,不包含内含子。

mtDNA 缺乏有效的基因修复系统,而且由于线粒体自身的特点使之极易受损。原因可能有以下几点:(1) mtDNA 几乎不受 DNA 结合蛋白质(组蛋白)的保护,即是裸露的,易受外界因素损伤;(2)线粒体内脂肪/DNA 的比值很高,使具有嗜脂性的致癌物优先在占细胞总 DNA 量很少的 mtDNA 上聚集;(3)mtDNA 在整个细胞周期中处于不停的合成状态,易受外界因素的干扰,稳定性差;(4)线粒体内氧浓度很高,易产生氧自由基及过氧化氢等活性氧簇,他本身又不能合成谷胱甘肽将其有效去除,因此

mtDNA 易受活性氧损伤^[6],造成核酸片段的丢失、碱基修饰以及插入突变等,尤以核酸片段的丢失最为常见;(5)mtDNA 在复制时由于 mtDNA 多聚酶 γ 的校对性差,以及 tRNA 基因部位易形成发夹样结构导致其复制错配频率明显高于核 DNA^[7]。

mtDNA 是决定线粒体功能的一个重要因素,再加上 mtDNA 无内含子,所以 mtDNA 损伤更具有功能性的结果。若 mtDNA 发生了损伤,必然影响线粒体功能^[8]。

在梗阻性黄疸时,机体自由基生成增加而抗氧化活力降低^[9],因而产生大量氧自由基,而氧自由基是损害 mtDNA 的一个重要因素,并且在肝细胞内,因胆汁淤积造成二硫化谷胱甘肽生成减少,其对氧自由基的清除能力及对损伤 mtDNA 的修复能力也大幅度下降,因而造成 mtDNA 的损伤。在先前的实验中,我们利用 LA-PCR 结合限制性酶切分析及基因测序方法,发现在大鼠梗阻性黄疸肝细胞中,mtDNA 存在着 4101~15294 碱基之间的长约 11 194 bp 的片段缺失。但在哺乳动物细胞中,1 个线粒体中可含有 2~10 个 mtDNA,而整个细胞可含有 1 000 多个 mtDNA,要维持线粒体正常的呼吸功能,要求细胞内要有足够的正常 mtDNA 拷贝数^[10],而损伤型 mtDNA 的数目也需达到某种程度才足以引起某器官或组织的功能异常。为此,我们利用荧光定量 PCR 方法,对梗阻性黄疸大鼠肝细胞 mtDNA 的损伤情况进行了定量研究,发现梗阻性黄疸大鼠肝细胞中,不光存在着 mtDNA 的片段缺失损伤,同时还存在着 mtDNA 的拷贝数减少,这一切都造成了细胞内正常 mtDNA 拷贝数的减少,从而对线粒体的功能造成影响,具体表现为 RCR、磷氧比及肝组织 ATP 含量下降;并且随着梗阻时间的延长,黄疸的加深,mtDNA 的损伤越加严重,主要表现为总 mtDNA 拷贝数减少,同时缺失型 mtDNA 在

总 mtDNA 中的比例增加,相应的其线粒体功能损害也更明显。而线粒体是细胞能量提供的场所,线粒体功能是决定肝细胞功能的一个重要因素,线粒体功能的损伤,必然影响到肝细胞功能。因而我们认为,梗阻性黄疸大鼠肝细胞 mtDNA 的损伤,是造成肝细胞线粒体功能以及肝功能受损的重要因素。这为研究梗阻性黄疸肝功能的损伤机制及保护手段提供了新的思路,为临床上保护及改善梗阻性黄疸围手术期肝功能提供帮助。

[参考文献]

- [1] Spivey J R. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes: role of ATP depletion and cytosolic free Calcium[J]. *J Clin Invest*, 1993, 92: 17-24.
 - [2] Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury[J]. *J Hepatol*, 2000, 32: 39-47.
 - [3] 祝建勇, 别平, 陈应果, 等. 生长激素在梗阻性黄疸大鼠围手术期应用的意义[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26: 1935-1937.
 - [4] Estabrook P W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios[J]. *Methods in Enzymology*, 1967, 10: 41-45.
 - [5] Kimmich G A, Randles J, Brands J S. Assay of picomole of amount of ATP, ADP, AMP use the luciferase enzyme system[J]. *Anal Biochem*, 1975, 69: 187-206.
 - [6] Fariss M W, Chan C B, Patel M, et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress[J]. *Mol Interv*, 2005, 5: 94-111.
 - [7] Pinz K G, Shibutani S, Bogenhagen D F, et al. Action of mitochondrial DNA polymerase gamma at sites of base loss or oxidative damage[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 9202-9206.
 - [8] Tustsui H. Mitochondrial oxidative stress and heart failure[J]. *Intern Med*, 2006, 45: 809-813.
 - [9] Caglikulekci M, Dirlik M, Pata C, et al. Effect of N-acetylcysteine on blood and tissue lipid peroxidation in lipopolysaccharide-induced obstructive jaundice[J]. *J Invest Surg*, 2006, 19: 175-184.
 - [10] Dimauro S, Moraes C T. Mitochondrial encephalomyopathies[J]. *Arch Neurol*, 1993, 50: 1197-1208.
- [收稿日期] 2006-08-29 [修回日期] 2006-12-26
[本文编辑] 孙岩