

老年大鼠大脑皮质、海马和小脑的线粒体 DNA 缺失突变

项平, 高国全, 周丽华, 姚志彬

(中山医科大学脑研究室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】测定老年大鼠脑缺失型 mtDNA 比例, 探讨 mtDNA 缺失与脑衰老的关系, 为研究其分子机制提供基础资料。

【方法】用碱裂解法抽提青年(3个月)SD大鼠10只和老年(24个月)SD大鼠17只的大鼠皮质、海马和小脑的 mtDNA。稀释 PCR 法测 mtDNA 的缺失比例。【结果】青年鼠和老年鼠大脑皮质、海马和小脑均存在缺失型 mtDNA, 缺失片段为 4 834 bp。青年鼠各脑区缺失型 mtDNA 比例分别为 0.000 156%、0.000 148%、0.000 152%; 老年鼠上述 3 个脑区缺失型 mtDNA 比例分别是 0.001 446%、0.001 484%、0.000 987%, 是青年鼠的 9、10 和 6.5 倍。【结论】衰老时脑缺失型 mtDNA 比例增多, 以海马的 mtDNA 缺失增多最为显著。提示 mtDNA 缺失可能是神经元衰老性退变的主要因素之一。

关键词: DNA, 线粒体/遗传学; 基因缺失; 衰老; 脑/生理学

中图分类号: R 338 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)01-0010-03

Mitochondrial DNA Deletion in the Cerebral Cortex, Hippocampus and Cerebellum of the Aged Rats

XIANG Ping, GAO Guo-quan, ZHOU Li-hua, YAO Zhi-bin

(Brain Research Unit, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089, China)

Abstract:【Objective】By measuring the ratio of mtDNA deletion of brain tissue, the relationship between mtDNA deletion and brain aging would be found in order to explain the molecular mechanism of aging. 【Method】The mtDNA of the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of ten young (3 months) and seventeen aged (24 months) SD rats were isolated by alkaline extraction. The ratio of mtDNA deletion was measured by serial dilution PCR. 【Result】The 4 834 bp deletion in mtDNA was found in the brain tissue of young and aged rats. The ratios of deleted mtDNA were similar in the cerebral cortex, hippocampus, cerebellum of young rats (0.000 156%, 0.000 148%, 0.000 152%). The ratios of aged rats increased by 9, 10 and 6.5-fold in the three brain regions over young rats. 【Conclusions】mtDNA deletion also accumulated in the aged rat brain. It suggests that the accumulation of deleted mtDNA may be one of important factors of neuronal degeneration with aging.

Key words: DNA, mitochondria/genetics; gene deletion; aging; brain/physiology

线粒体 DNA(mtDNA)是一双链环状分子, 长度约为 16 碱基对^[1]。线粒体 DNA 编码线粒体内膜 60 个多肽中的 13 个多肽, 2 个 rRNA 及 22 个 tRNA, 编码的多肽是细胞内电子传递和氧化磷酸化的酶复合物。机体高分化及需氧量多的组织如脑、肌肉等, 由于存在大量的氧自由基, 易损伤 mtDNA, 使其

发生突变, 点突变和缺失突变是 mtDNA 突变的两种主要形式^[2]。最常见的缺失片段包括编码部分 ATP 合酶亚单位 8, ATP 合酶亚单位 6, CO III ND1-ND5 基因。由于衰老时机体能量代谢失控^[3], 为此, 本研究用 PCR 方法检测老年大鼠脑组织 mtDNA 缺失突变, 以探讨线粒体 DNA 缺失与脑衰老的关

收稿日期: 1999-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(39670244)

作者简介: 项平, 男, 安徽人, 讲师, 硕士, 现在蚌埠医学院解剖教研室, 邮编: 233001。

系,为研究其分子机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

清洁级雄性健康 SD 大鼠,青年鼠(3月龄)10只,老年鼠(24月龄)17只,同一环境饲养,由中山医科大学动物中心提供。

1.2 线粒体 DNA 提取^[4]

断头杀死大鼠,立即取出大脑,用 GTE 缓冲液(500 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L EDTA、25 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)匀浆,匀浆液离心,500 g × 5 min,取上清离心,800 g × 10 min,沉淀物为线粒体。用 NS 溶液(0.2 mol/L NaOH、1% SDS)裂解线粒体,加入 3 mol/L 乙酸钾,1 000 × g 离心 20 min,去除沉淀。上清液用等体积苯酚-氯仿抽提两次,加入 RNase I (100 μg/L)去除 RNA。用含 150 mmol/L NaCl 的乙醇沉淀 mtDNA,沉淀物真空干燥后,溶解在适量的 TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)中。

1.3 稀释 PCR^[5]

参照大鼠线粒体 DNA 全序列^[6],自行设计,由中国科学院上海细胞所合成两对引物(表 1)。

表 1 引物设计参数

Table 1 The standard of primer

Primer	Location	Sequence(5' - 3')	Products(bp)
P ₁	17687-7709	GCITAGAGCGTTAACCTTTTAAG	5 430(normal)
P ₂	H13117-13099	AAGCGTGTCTAGATGCTTC	596(deleted)
P ₃	L15758-15777	ACAGGCATCTGCTTCTTACT	657(non-deleted)
P ₄	H117-98	CATGCTTAATCTTACCTCCA	

引物 P₁、P₂ 横跨 mtDNA 常见缺失区,扩增出 5 430 bp 产物为正常 mtDNA 以及 596 bp 产物(代表缺失型 mtDNA)。引物 P₃、P₄ 位于无缺失区,扩增出 657 bp 产物代表总的 mtDNA。引物 P₁、P₂ PCR 50 μL 反应体系: mtDNA 100 ng, 引物浓度各为 100 pmol, dNTPs 200 μmol/L, Mg²⁺ 1.8 mmol/L, Taq 酶 2.5 U(加拿大真达公司), 10×buffer 5.0 μL, 石蜡油 40 μL。PCR 反应条件 94 °C 变性 10 min, 加 Taq 酶。94 °C 1 min → 56 °C 1 min → 72 °C 5 min, 共 30 循环, 末次 10 min 延伸。

为了消除 5 430 bp 带对扩增 596 bp 带的影响,

模板先用 Taq I 酶(Promega 公司)消化, Taq I 酶切点为 TCGA, 位于 mtDNA 缺失区, Taq I 酶消化反应 50 μL 体系: mtDNA 1 μg、Taq I 3 U、Buffer 5.0 μL。65 °C 孵育 4 h, 94 °C 灭活 5 min。PCR 扩增仅有 596 bp 的 50 μL 同 P₁、P₂。引物 P₃、P₄ PCR 反应体系: mtDNA 50 ng, 其余条件同扩增仅有 596 bp 带的条件。取 PCR 扩增产物(8.0 μL)经含 EB 的 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯下观察并拍照记录实验结果。用 IBAS Rel 2.0 全自动图像分析系统(德国 OPTON 公司), 对底片进行定量分析。

缺失型 mtDNA 比例即缺失型 mtDNA 占总的 mtDNA 的百分比例。稀释 PCR 法对缺失型 mtDNA 比例定量是以同一样本 mtDNA 为模板按一定稀释梯度稀释, 分别用 P₁、P₂ 和 P₃、P₄ 进行 PCR 扩增, P₁、P₂ 扩增产物 596 bp 代表缺失型 mtDNA 含量, P₃、P₄ 扩增产物 657 bp 代表总 mtDNA 含量, 二者扩增产物光密度相等时的最小 mtDNA 模板量的比例即代表缺失型 mtDNA 比例。计算能扩增出 596 bp 和 657 bp 带的最小 mtDNA 浓度比例以及它们的条带积分光密度(integrated optical density)比例, 从而得出缺失型 mtDNA 的比例。

2 结 果

2.1 mtDNA 片段缺失的检测

青年鼠和老年鼠脑 mtDNA 均存在缺失, 缺失片段为 4 834 bp(5 430-596=4 834), 如图 1。

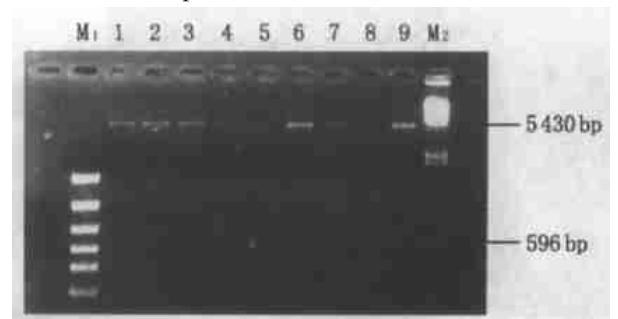


图 1 引物 P₁、P₂ PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 The electrophoresis of the PCR products of primer P₁ and P₂

M₁: DNA marker (1 543 994, 695, 515, 377, 237 bp); M₂: λDNA/ Hind III marker(23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564, 125 bp). 1: cerebral cortex; 2: hippocampus; 3: cerebellum of young rats. 4, 7: cerebral cortex of aged rats; 5, 8: hippocampus of aged rats; 6, 9: cerebellum of aged rats

2.2 缺失型 mtDNA PCR 扩增产物积分光密度比较

取 50 ng mtDNA, PCR 扩增 596 bp 产物, 测得各脑区的 PCR 产物积分光密度(表 2)。可见老年大鼠大脑皮质、海马和小脑缺失型 mtDNA 明显多于青年鼠, 老年大鼠小脑缺失型 mtDNA 明显少于大脑皮质和海马, 青年组 3 个脑区无差异。

表 2 两组大鼠脑 mtDNA 缺失产物(4 834 bp) 积分光密度比较

Table 2 The integrated optical density of 4 834 bp deletion of mtDNA products of young and aged rats (OPTDI)

	Young rats (n = 10)	Aged rats (n = 17)
Cortex	17.5 ± 1.5	41.4 ¹⁾
Hippocampus	15.7 ± 0.3	38.4 ¹⁾
Cerebellum	17.2 ± 1.6	23.7 ²⁾

Compared with young rats: 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.001$

2.3 两组大鼠各脑区缺失型 mtDNA 比例

用上述各脑区缺失型 mtDNA PCR 产物积分光密度接近均数的模板行稀释 PCR, 算出缺失型 mtDNA 的比例, 以代表该脑区的缺失型 mtDNA 的比例(图 2)。结果表明, 老年鼠大脑皮质、海马和小脑缺失型 mtDNA 比例较青年鼠分别增高 9、10 和 6.5 倍。

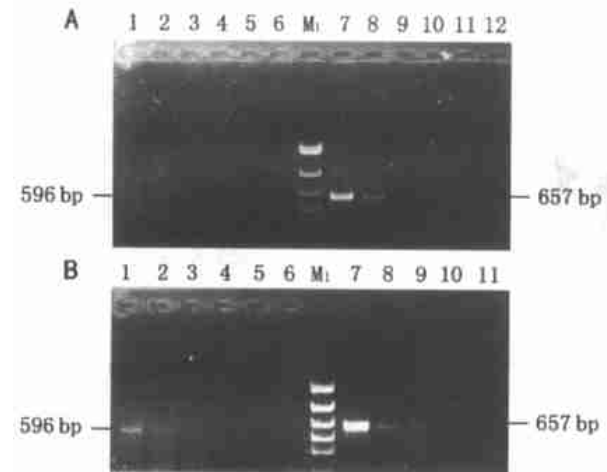


图 2 两组大鼠大脑皮质 mtDNA 模板稀释 PCR 产物
Fig. 2 Dilute PCR products of cerebral mtDNA of young and aged rats

A: young rats; B: aged rats; M₁: marker; Concentration of mtDNA: 1~6 were $2.5 \times 10^{2-(-3)}$ ng by 10^{-1} times; 7~12 were $2.5 \times 10^{2-(-7)}$ ng by 10^{-1} times; integrated optical density/OPTDI in A1, A2, B1, B2, B3, B7, B8, B9, B10 were 19.24, 11.47, 45.52, 29.73, 20.25, 40.46, 28.10, 18.45, 14.00 respectively.

3 讨论

缺失型 mtDNA 在心脏、肌肉和肝脏等组织随年龄递增而增多^[6]。本研究证实了衰老时脑组织缺失型 mtDNA 比例也增多, 这可能是由于氧自由基损伤 mtDNA 而引起的, 并随年龄递增进行性加重^[7]。神经元的线粒体呼吸链是脑内氧自由基生成的主要场所。正常情况下氧自由基一边生成, 一边被清除。当氧自由基累积后, 氧自由基就“攻击”神经元的生物物质(膜、蛋白质、核酸等), 导致线粒体 DNA 缺失突变、线粒体膜结构破坏以及其他亚细胞结构损害^[8]。由于 mtDNA 缺失编码的大多数是细胞电子传递和氧化磷酸化酶复合物, 线粒体 DNA 发生缺失突变, 必将导致呼吸链功能进一步缺失, 出现氧自由基增多和 ATP 生成减少, 增多的氧自由基又“攻击”mtDNA 和其他物质, 结果缺失型 mtDNA 比例增高^[9]。衰老时脑组织 mtDNA 缺失比例大幅度增加, 其直接后果是神经元的能量代谢障碍, 并进而损害神经元的结构和功能。此外, 我们发现老年鼠小脑 mtDNA 缺失比例明显低于大脑皮质和海马, 表明在正常衰老过程中各脑区对 mtDNA 缺失的易感性是不同的, 小脑可能存在某种抗缺失突变机制。

我室以往研究及其他学者研究均证实, 衰老导致神经元丢失及神经元内粗面内质网合成减少、高尔基复合体的分泌功能降低、溶酶体中的酶活性降低、线粒体崩溃、脂褐素沉积^[10]。神经元这些改变与线粒体的结构和功能衰退(能量代谢降低, 膜破坏等)密切联系。因此, 我们认为脑组织缺失型 mtDNA 比例增高是导致神经元衰老性退变的重要因素之一。

参考文献:

- [1] Cantatore P, Roberti M, Rainaldi G, *et al.* The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus* [J]. *J Biol Evol*, 1989, 264(19): 10965.
- [2] Gadaleta M N, Rainaldi G, Lessa AMS, *et al.* Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rat [J]. *Mutat Res*, 1992, 275(3~6): 181.
- [3] Shigenaga M K, Hagen T M, Ames B N. Oxidative damage

- and mitochondrial decay in aging[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23): 10771.
- [4] Palva T K, Palva E T. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction[J]. *FEBS*, 1985, 192(2): 267.
- [5] Hamblet N S, Castora F J. Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 207(2): 839.
- [6] Richter C, Park J W, Ames B N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(17): 6465.
- [7] Lee H G, Pong C Y, Hsu H S *et al*. Differential accumulation of 4 977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human aging[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1226(1): 37.
- [8] 姚志彬, 陈以慈. 海马神经元和神经递质的衰老性变化及自由基分析[J]. *中山医科大学学报*, 1988, 9(1): 5.
- [9] Wei Y H. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events[J]. *Mutat Res*, 1992, 275(3~6): 145
- [10] 洪岸, 姚志彬, 陈以慈, 等. 老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触改变[J]. *解剖学报*, 1996, 27(2): 164.
- (编辑 刘清海)

简讯

中山一院 1999 年科技成果奖大丰收

中山一院 1999 年向卫生部申报 5 项科技成果奖, 全部中奖。这次获奖项数在全国医院系统排名第一。其中 1 项更获得卫生部科技进步一等奖, 使我院, 乃至中山医科大学实现了一等奖奖项“零”的突破。

附: 获奖项目:

记录号	颁奖单位	等级	获奖名称	科室	获奖名单			年		
162	卫生部	一等	Wilson's 病分子生物学研究	神经科	徐评议 刘焯霖	梁秀龄	马少春	王丽娟	1999	
164	卫生部	二等	现代辅助生育系列技术的建立	妇产科	庄广伦 梁晓燕	周灿权 李晓红	李蓉	李洁 张敏芳	李满	1999
165	卫生部	三等	雪旺细胞及其神经营养蛋白的系列研究	显微外科	朱家恺 顾熊飞	许扬滨 高贵	张自杰	顾立强 吴波以	1999	
168	卫生部	三等	供体移植抗原与毒素连接物对移植排斥反应的影响	胃肠外科	王吉甫	朱晓峰	兰平	何晓东	1999	
169	卫生部	三等	高血压动脉硬化性脑梗死的病理机制及临床系列研究	神经科	黄如训 黄海威	方燕南	李玲	曾进胜	1999	

(吴金泉)

热烈祝贺

中山医科大学光华口腔医学院院长凌均^图教授受聘为澳门牙科学会顾问。