

·基础研究·

12周跑台训练对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏肝细胞癌下调的线粒体转运蛋白表达的改变及其对线粒体功能的影响

刘艳环¹ 刘克敏² 马国栋^{1,3}

摘要

目的:研究12周跑台训练后非酒精性脂肪肝(NAFLD)小鼠肝脏肝细胞癌下调的线粒体转运蛋白(HDMCP)的变化及其对肝脏线粒体功能的影响。

方法:雄性8周龄ApoE^{-/-}小鼠48只,随机分为4组,对照组(C,n=12),14周西方膳食组(模型组,M,n=12),继续西方膳食+12周跑台运动组(ME,n=12);西方膳食26周组(MM,n=12)。跑台训练12周,坡度为0°,跑速13m/min,60min/次,每周5次。测定肝脏HDMCPmRNA的表达,线粒体活性氧及H₂O₂生成,线粒体ATP合成活力,肝脏ATP含量,线粒体态3呼吸、态4呼吸及呼吸控制比(RCR)。

结果:耐力训练组(0.53±0.09)肝脏HDMCPmRNA表达显著低于C组(0.72±0.10)、M组(1.24±0.16)、MM组(1.32±0.17);耐力训练组肝脏线粒体ATP合成活力(11.23±2.53)及肝脏组织ATP含量(10.57±2.12)均显著高于MM组(7.36±1.22,8.32±1.41);耐力训练组肝脏线粒体ROS(42.51±4.12)及H₂O₂生成(18.33±3.10)均显著低于MM组(68.94±5.99,24.31±3.56);耐力训练组线粒体态3呼吸(12.21±1.32)与RCR(2.78±0.89)均显著高于MM组(10.76±1.11,1.75±0.69),而态4呼吸(4.40±1.32)显著低于MM组(6.14±1.45)。

结论:12周跑台训练可以显著降低肝脏HDMCP表达,可能进而减少线粒体质子漏,增强线粒体ATP合成,改善线粒体功能。

关键词 非酒精性脂肪肝;耐力训练;肝细胞癌下调的线粒体转运蛋白;线粒体功能

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-01-0012-04

The change of 12-week treadmill training on the HDMCP expression of liver tissue and its effect on mitochondrial function in no-alcoholic fatty liver disease mice/LIU Yanhuan, LIU Kemin, MA Guodong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(1): 12-15

Abstract

Objective: To investigate the change of 12-week treadmill training on the HDMCP expression of liver tissue and its effect on mitochondrial function in no-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)mice.

Method: Forty-eight male ApoE^{-/-} mice were divided into four groups randomly:①14-week normal diet group(C group, n=12); ②14-week western diet model group(M group, n=12); ③western diet plus 12-week treadmill training group(ME group, n=12); ④26-week western diet (MM, n=12). Mice were trained on a treadmill for 12 weeks, 60 minutes per day, 5 days per week, 0° grade (at 13m/min). Every period ended, mice were sacrificed and liver was saved for measuring the expression of HDMCP mRNA, and the change of activity of ATP synthetase, and variations of state 3 respiration, state 4 respiration and RCR, mitochondrial ROS production and content of ATP in liver tissue.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.005

1 山东理工大学体育学院,山东,淄博,255049;2 大连医科大学运动医学教研室,辽宁,大连,116027;3 通讯作者
作者简介:刘艳环,女,讲师;收稿日期:2010-03-19

Result: The expression of HDMCP in ME group(0.53 ± 0.09) was significantly lower than that in C group(0.72 ± 0.10), M group (1.24 ± 0.16) and MM group(1.32 ± 0.17). The activity of ATP synthetase(11.23 ± 2.53) and content of ATP in liver tissue(10.57 ± 2.12) in ME group were significantly higher than those in MM group($7.36 \pm 1.22, 8.32 \pm 1.41$). The ROS (42.51 ± 4.12) and H_2O_2 (18.33 ± 3.10) production of mitochondria in ME group were significantly lower than those in MM group($68.94 \pm 5.99, 24.31 \pm 3.56$). The state3 respiration(12.21 ± 1.32) and RCR(2.78 ± 0.89) in ME group were significantly higher than those in MM group($10.76 \pm 1.11, 1.75 \pm 0.69$), however, state4 respiration (4.40 ± 1.32) was lower than that in MM group(6.14 ± 1.45).

Conclusion: Twelve training significantly decreases HDMCP expression, which maybe decrease mitochondrial proton leak, enhance the synthesis of ATP of mitochondria, and ameliorate mitochondrial function in NAFLD mice.

Author's address School of P.E, Shandong University of Technology, Shandong, Zibo, 255049

Key word non-alcoholic fatty liver disease; endurance training; HCC-down-regulated mitochondrial carrier protein; mitochondrial function

非酒精性脂肪肝(no-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)可以导致ATP合成平衡失调,活性氧生成增加。因此,维持线粒体正常功能是NAFLD病变程度改变的重要前提^[1]。Michelle等^[2]2004年在肝细胞癌中克隆出一个新的基因,其蛋白他们命名为肝细胞癌下调的线粒体转运蛋白(HCC-down-regulated mitochondrial carrier protein, HDMCP)。Xi Jin等^[3]报道HDMCP与NAFLD病变程度有关,并且通过RNA干扰技术证明在肝脏培养细胞中HDMCP具有减少线粒体ATP合成和 H_2O_2 生成的功能。

我们前期工作证实,耐力训练可以降低非酒精性脂肪肝UCP2表达^[4]。那么耐力训练对HDMCP表达有何影响?HDMCP表达与线粒体活性氧的产生和ATP合成的关系如何?耐力训练可能降低HDMCP表达,从而减少线粒体质子漏,从而提高线粒体ATP合成能力,同时,经耐力训练后线粒体抗氧化能力增强,从而减少肝脏活性氧的生成。本研究拟以西方膳食诱导的非酒精性脂肪肝为模型,以跑台运动为手段,研究HDMCP对线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及运动方式

雄性8周龄ApoE-/-小鼠48只。实验动物随机分为4组:普通膳食14周对照组(C, n=12);14周西方膳食组(模型组, M, n=12);继续西方膳食+12周跑台运动组(ME, n=12);西方膳食26周组(MM, n=12)。西方膳食为(21%脂肪, 0.15%胆固醇)^[5]。参考Fernando P等^[6]文献设定跑台运动方案:0°坡度,小

鼠第1—2周由10m/min(相当于70%的最大摄氧量),30min,逐渐增加至13m/min(相当于77.5%的最大摄氧量),60min,自第3周开始为13m/min,60min,共运动12周,每周5次。每一组在实验结束并禁食12h处死,取肝脏,部分用于测定线粒体呼吸,部分-70℃保存,用于测定基因表达。每天光照均为12h,自由饮水。

1.2 肝脏线粒体的提取

断头处死迅速取出肝脏约2g,用冷生理盐水将血污冲洗干净,剔除结缔组织、剪碎,加10ml预冷生理盐水,电动匀浆,1150转/min。0—4℃离心,600g离心10min。弃沉淀,上清于10000g离心10min。沉淀用5ml预冷生理盐水悬浮。10000g离心10min。沉淀悬浮在2ml冷生理盐水中,悬浮液即为肝脏线粒体。

1.3 测试指标及方法

1.3.1 肝脏组织脂肪病变程度的光镜观察:每一阶段实验动物处死后,取肝脏并浸入生理盐水中洗掉血污,立即放入液氮冷却,然后放入-70℃恒温冰箱保存,以备光镜观察,HE染色。

1.3.2 肝脏线粒体呼吸的测定^[2]:采用Clark氧电极测定密闭反应体系中氧饱和度的变化,以测定线粒体态4呼吸,态3呼吸,同时计算呼吸控制比(RCR)。

1.3.3 肝脏线粒体活性氧生成及 H_2O_2 的测定:取已定量的肝脏线粒体悬液,加入测定介质中,测定介质为:130mmol/L KCl, 3.0mmol/L Hepes, 0.5mmol/L EDTA, 2.0mmol/L KH_2PO_4 (pH7.4)。采用DCFH-DA荧光燃料。避光37℃水浴15min。水浴后立即于荧

光分光光度计下测定5—10min(激发波长499nm,发射波长521nm)。测定设置为:时间增量1s;积分时间1s。测试过程保持37℃恒温,测定线粒体总活性氧生成。严格按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书检测肝脏线粒体H₂O₂生成。

1.3.4 肝脏线粒体ATP合成酶活性及肝脏组织ATP含量测定:采用荧光素-荧光素酶发光法,用20/20n型发光仪测定线粒体ATP酶活性与肝脏组织ATP含量。

1.3.5 肝脏HDMCP mRNA的表达:用Trizol Reagent试剂盒(Mrcgene产品)抽提肝脏总RNA,利用荧光定量PCR扩增HDMCP^[7]。按照two steps SYBR RT-PCR Kit (TaKaRa)试剂盒说明书配制反应体系。

HDMCP引物序列:

上游:5'-GCCACTCCTTGGCCACCTAC-3',

下游:5'-CACAGCCTCATAAGCCACGA-3',

β-actin引物序列:

上游:5'-ATCCGTAAGACCTCTATGC-3',

下游:5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'

目的基因的相对量为:目的基因初始量/内参基因初始量=2^(Ct 目的-Ct 内参)。

1.4 统计学分析

通过SPSS统计软件(11.5)进行统计学分析,采用双因素方差分析进行比较。显著性设定为P<0.05。

2 结果

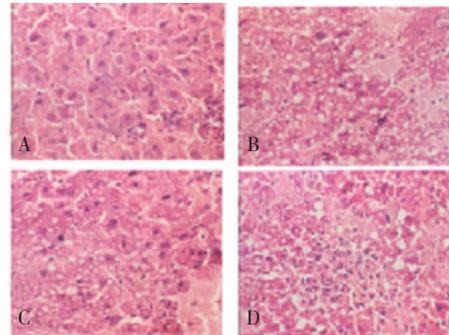
2.1 光镜观察肝脏脂肪肝病程度

见图1。对每一只小鼠肝脏进行切片观察,每组小鼠肝脏病变程度表现一致。小鼠在经过14周西方膳食后,肝脏组织中出现了明显的脂肪滴,说明脂肪肝模型已经建立成功(图1C),26周组脂肪滴明显(1图B);耐力训练组脂肪滴明显减少(1图D);对照组未见明显的脂肪滴(见图A)。

2.2 耐力训练对线粒体呼吸功能的影响

见表1。肝脏线粒体态3呼吸M组、MM组与ME组显著低于C组,M组与MM组之间差异未见显著性,ME组显著高于M组与MM组;态4呼吸M组、MM组与ME组显著高于C组,M组与MM组之间差

图1 耐力训练对小鼠肝脏组织脂肪病变程度的影响



异未见显著性,ME组显著低于M组与MM组;RCR M组、MM组与ME组显著低于C组,M组显著高于MM,ME组显著高于M组与MM组。

2.3 耐力训练对肝脏线粒体ATP合成酶活性、肝脏ATP含量、线粒体ROS及H₂O₂生成的影响

见表2。西方膳食导致线粒体ROS及H₂O₂显著升高,而ATP酶活性及肝组织ATP含量显著降低;耐力训练可以显著降低ROS及H₂O₂水平,线粒体ATP合成酶活性及肝脏组织ATP含量显著升高,但也未恢复到正常水平。

2.4 耐力训练对肝脏HDMCP mRNA表达的影响

HDMCP mRNA表达,C组(0.72 ± 0.10)与M(1.24 ± 0.16)、MM(1.32 ± 0.17)和ME(0.53 ± 0.09)组比较显著升高(P<0.05);M组与ME组比较表达显著降低(P<0.05),MM组未见显著性改变(P>0.05);MM组与ME组比较表达显著下降(P<0.05)。

表1 耐力训练对肝脏线粒体呼吸功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	State3 (nmolO ₂ /min·mgpro)	State4 (nmolO ₂ /min·mgpro)	RCR
C组	13.48 ± 2.63	3.35 ± 0.87	4.02 ± 1.27
M组	10.98 ± 1.06 ^①	5.87 ± 1.27 ^①	2.25 ± 0.86 ^①
MM组	10.76 ± 1.11 ^①	6.14 ± 1.45 ^①	1.75 ± 0.69 ^{①②}
ME组	12.21 ± 1.32 ^{①②③}	4.40 ± 1.32 ^{①②③}	2.78 ± 0.89 ^{①②③}

①与C组比较P<0.05;②与M组比较P<0.05;③与MM组比较P<0.05

3 讨论

线粒体异常与非酒精性脂肪肝关系密切。我们前期研究证实^[4],耐力训练对非酒精性脂肪肝有显著的预防作用。本研究发现耐力训练后线粒体态3呼吸和RCR显著升高,态4呼吸显著降低,说明线粒

表2 耐力训练对肝脏线粒体ATP合成酶活性、肝脏ATP含量、线粒体ROS及H₂O₂生成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS(nmol/mg pro)	ATP合成酶活性(nmol/min·mg pro)	H ₂ O ₂ (nmol/mg pro)	肝组织ATP含量(nmol/g pro)
C组	26.22 ± 2.11	15.46 ± 2.51	14.32 ± 2.14	18.36 ± 3.42
M组	51.33 ± 5.41 ^①	10.11 ± 2.01 ^①	19.87.31 ± 2.89 ^①	11.25 ± 2.74 ^①
MM组	68.94 ± 5.99 ^{①②}	7.36 ± 1.22 ^{①②}	24.31 ± 3.56 ^{①②}	8.32 ± 1.41 ^{①②}
ME组	42.51 ± 4.12 ^{①②③}	11.23 ± 2.53 ^{①③}	18.33 ± 3.10 ^{①②③}	10.57 ± 2.12 ^{①③}

①与C组比较 $P < 0.05$; ②与M组比较 $P < 0.05$; ③与MM组比较 $P < 0.05$

体质子漏减弱。引起线粒体质子漏的原因尚未完全清楚。稍早的研究认为,线粒体质子漏与解偶联蛋白关系密切。与非酒精性脂肪肝关系密切的蛋白质普遍认为是解偶联蛋白2(UCP2)^[8]。然而,目前研究结果显示,在正常的肝细胞中未检测到UCPs的存在。尽管有一些研究发现在NAFLD的动物和细胞模型中UCP2得到了表达,但其仅仅是mRNA的表达,而未检测到蛋白质的存在^[9]。最近的研究表明在UCP2基因敲除鼠和正常鼠之间,其脂肪肝病程度未见显著性差异^[10]。鉴于此,我们推测UCP2的解偶联功能可能有限。Michelle G. K.等^[2]2004年在肝细胞癌中克隆出一个新的基因,其蛋白他们命名为肝细胞癌下调的线粒体转运蛋白(HDMCP),该蛋白位于线粒体内膜,作者发现,HDMCP过度表达能够明显引起线粒体膜电位降低,质子漏增强,导致细胞内ATP含量显著降低,因此该作者认为,HDMCP具有解偶联的功能。本研究也发现,经过14周的西方膳食后,肝脏HDMCP表达显著升高,同时线粒体态4呼吸显著加强,ATP合成能力及肝组织ATP含量显著降低,说明HDMCP可能具有解偶联功能。

线粒体被认为是哺乳类动物肝脏自由基的主要来源。在正常情况下,大约有1%—3%的氧形成超氧阴离子^[11],但这一比例在某些特殊情况下会显著升高,如非酒精性脂肪肝发病过程中,线粒体超氧阴离子生成会明显升高,出现氧化应激现象^[12]。本研究也发现,非酒精性脂肪肝发病过程中线粒体ROS和H₂O₂生成显著升高,因此,非酒精性脂肪肝发病过程中活性氧的增加已经是不争的事实。本研究发现随着HDMCP表达的升高,线粒体ATP合成能力下降,态4呼吸加强。基于HDMCP具有解偶联的特性以及本研究的事实,推测HDMCP可能通过解偶联的方式在一定程度上抑制活性氧的生成,而解偶联作用可能也降低了ATP合成的能力。如何既能保证线粒体免受氧化损伤,又能保证ATP合成能力

呢?运动可能是解决这一问题的有效的途径。我们前期的研究发现,小鼠经过12周的跑台运动后,肝脏抗氧化能力显著提高。本研究发现,耐力训练后,HDMCP表达显著降低,态4呼吸显著降低,ATP合成能力及肝组织ATP含量显著升高。因此,我们认为在非酒精性脂肪肝发病过程中,线粒体的氧化损伤可能比能量暂时缺乏危害更大,线粒体不得以消耗一部分能量作为代价,通过HDMCP解偶联的方式减少线粒体活性氧的生成,当耐力训练后线粒体抗氧化能力显著加强,基本满足清除线粒体活性氧的需要,无需通过解偶联的方式抑制活性氧的生成,HDMCP表达降低,减少线粒体质子漏,提高线粒体ATP合成能力。所以,HDMCP作为一种调节蛋白,调控线粒体活性氧生成与ATP合成的平衡。而对于活性氧的清除,抗氧化酶系统才是主体,HDMCP仅起辅助作用。

4 结论

12周跑台训练可以显著降低肝脏HDMCP表达,进而减少线粒体质子漏,增强线粒体ATP合成,改善线粒体功能。

参考文献

- [1] Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, et al. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Mol Aspects Med*, 2008,29(1-2):22—35.
- [2] Tan MG, Ooi LL, Aw SE, et al. Cloning and identification of hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein, a novel liver-specific uncoupling protein[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(43):45235—45244.
- [3] Xi Jin, Yi-da Yang, Kun Chen, Zhi-yuan Lv, Lin Zheng. HD-MCP uncouples yeast mitochondrial respiration and alleviates steatosis in L02 and hepG2 cells by decreasing ATP and H₂O₂ levels: A novel mechanism for NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(5):1019—1028.

(下转第21页)