

冠心病患者线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 ①基因片段的重排

邱小忠, 陈 媛, 周 玫

(第一军医大学抗衰老研究所自由基医学研究室, 广州 510515)

[主题词] 线粒体 DNA 缺失; 细胞色素 C 氧化酶亚基 ① 基因; 冠状动脉疾病

[摘 要] 采用玻璃粉微量吸附法获取 DNA 直接作为 PCR 反应的模板, 利用巢式 PCR 技术, 检测冠心病患者血细胞内编码细胞色素 C 氧化酶亚基 ①的线粒体 DNA 扩增片段多态性, 探讨线粒体 DNA 的片段缺失与动脉粥样硬化发生发展的关系。研究发现在全部冠心病患者编码细胞色素 C 氧化酶亚基 ①的基因中出现了大约 100 bp 的缺失片段, 其中 1 例冠心病患者中还出现了大约 450 bp 核基因组和 600 bp 的线粒体 DNA 扩增片段, 而在正常对照老人中没有出现片段的重排现象。表明冠心病患者中存在该基因片段的缺失和模板量减少的现象, 该基因可能参与了冠状动脉粥样硬化的形成与发展, 编码呼吸链复合物一些亚基线粒体 DNA 片段的重排可能是动脉粥样硬化进行性发展的恶化因素。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The Rearrangement in Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit ① Gene and Coronary Heart Disease

QIU Xiao- Zhong, CHEN Yuan, and ZHOU Mei

(Research Lab of Free Radical Medicine, Anti- Senility Research Center, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Mitochondrial DNA Deletion; Cytochrome C Oxidase Subunit ① Gene; Coronary Heart Disease

ABSTRACT **Aim** To explore the relationship between the pathogenesis of coronary heart disease and the rearrangement in the mitochondrial DNA(mtDNA). **Methods and Results** Traced mtDNA was adsorbed by glass milk method and was taken as the templet DNA of PCR directly. The nest PCR was used to test 100 bp corresponding to deleted mitochondrial DNA and was detected in five patients with coronary heart disease. A short fragment of approximately 600 bp corresponded inserted mitochondrial DNA was detected in one patient with coronary heart disease. These didn't appear in the normals. Another short fragment of approximately 450 bp corresponded to human nucleic genome. **Conclusion** The mitochondrial CO2 gene may be linked to the pathogenesis of coronary heart disease. The length mutations of the mtDNA that encodes several subunits of the respiratory chain complexes contribute to the depravation of some forms of atherosclerosis.

冠心病(coronary heart disease, CHD)是由遗传因素及环境因素共同决定的疾病,线粒体 DNA(mtDNA)损伤在冠心病发生发展中的作用已经受到普遍关注^[1],有研究揭示 mtDNA 损伤的积累能够导致细胞内氧化磷酸化基因的表达代偿性增加 3~ 5 倍,在心脏缺血的左心室内显示出最多的 mtDNA 损伤累积,表明和动脉硬化有关的氧化应激能大大提高线粒体的损伤程度,mtDNA 损伤包括 mtDNA 的碱基缺失、插入的重排和点突变,动物细胞的衰老过程伴随

着线粒体 DNA 的点突变和重排的不断积累过程^[2], mtDNA 的碱基缺失在冠心病患者中经常发现,有研究表明 mtDNA 4 977 bp 片段的缺失是正常人的 7~ 220 倍,同时,mtDNA 的 7 436 bp 缺失片段和 10 422 bp 缺失片段的缺失率也有所提高^[3]。然而,在冠心病等退行性病变中有关线粒体 CO2 基因片段的重排现象还未见报道。本文利用巢式 PCR 扩增冠心病患者编码细胞色素 C 氧化酶亚基 ①(CO ①)的 mtDNA 片段(CO2),根据扩增片段的多态性进一步阐明 mtDNA 和冠心病发生的关系。

[作者简介] 邱小忠,男,1968 年出生,江西宁都人,生物化学专业,博士,研究方向为自由基医学。陈媛,男,教授,1930 年出生,教授,博士生导师。

1 材料和方法

1.1 研究对象

冠心病组 6 例,男 2 例,女 4 例,年龄 76~82 岁,平均年龄 78.3 岁,冠心病诊断符合世界卫生组织确定的诊断标准^[4]。对照组 20 例,选自某军分区干休所正常健康老年人,年龄 66~79 岁,平均年龄 70.7 岁。

1.2 样品的采集和试剂

指头采血约 100 μ L,溶解于 300 μ L 的 7 g/L EDTA 溶液中,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。根据 Cambridge 线粒体 DNA 序列^[5]合成引物: CO2(+) 5' - CAAGCCAACCCCATGGCCTCC - 3', CO2(-) 5' - AGTATTTAGTTGGGGCATTTCAC - 3', 半巢式引物 Prime qhR: 5' - TCCTGAGCGTCTGAGATG - 3'。引物由美国 Gibco 公司合成,10 \times PCR 反应缓冲液, Taq DNA 聚合酶购自加拿大 Songon 公司, dNTPs 购自 Sigma 公司,玻璃粉由中山大学生命科学学院提供。

1.3 微量 DNA 模板的制备

取 30 μ L 的 EDTA 稀释血样,置于盛有 100 μ L TE(10 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L EDTA pH 8.0) 的 500 μ L 离心管中,加入相同体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次,10 000 g 离心 10 min,将上清液移入另一管中,加入 3 倍体积的 6 mol/L NaI,加入 1 μ L 的玻璃粉吸附 DNA 约 10 min,8 000 g 离心 1 min,利用洗脱液洗两次,晾干后直接加入 50 μ L 的 PCR 反应液,进行 PCR 扩增。

1.4 多聚酶链反应

玻璃粉吸附 DNA 晾干后直接加入 50 μ L 的 PCR 反应液(250 μ mol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, CO2(+) 和 CO2(-) 引物各 2 μ mol/L),进行第一次 PCR 扩增,94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后,加入 1 u DNA 聚合酶,按 94 $^{\circ}$ C 1 min、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min 循环 30 次。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,拍照分析。

1.5 半巢式多聚酶链反应扩增长度多态性分析^[6]

利用半巢式引物 P1 和 CO2(+) 对第一次 PCR 产物进行第二次扩增。取第一次 PCR 产物 1 μ L,加入 50 μ L PCR 反应液(10 \times PCR 反应液),94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后,加入 1 u DNA 聚合酶,按 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s 循环 30 次。扩增产物进行 1.4% 琼脂糖凝胶电泳,拍照并分析扩增产物的多态性。

2 结果

2.1 微量 DNA 模板的 PCR 反应

由于血液中含有较多的各种血红素等次生代谢

成分,影响 DNA 的提取质量,因此在常规提取过程中首先要对血细胞进行溶血处理。利用玻璃粉吸附法,操作前利用氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次,能很好地避免血液杂质对玻璃粉吸附的影响,整个过程无须酚的抽提,操作方便快捷,整个过程只需 30 min。

本实验利用引物 CO2(+/-) 进行第一次扩增,结果扩增出了所有 26 例老人的 901 bp CO2 基因片段,在琼脂糖凝胶电泳中获得了一条明显的扩增带,扩增产物特异性强(图 1, Figure 1),冠心病患者的 CO2 扩增片段明显较正常人弱(图 1 Lane 2、3)。

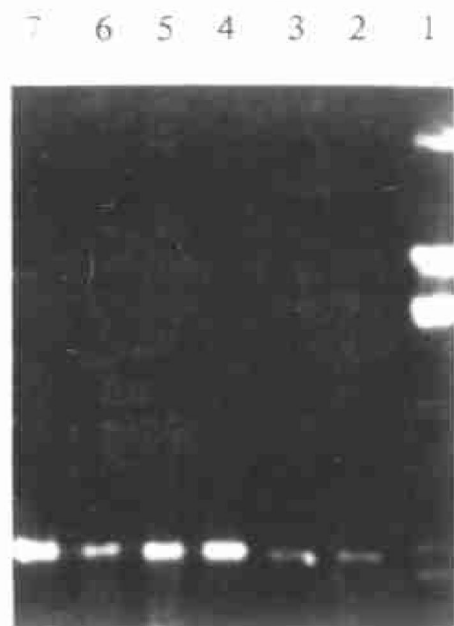


图 1. 冠心病患者和正常老人 CO2 基因片段扩增结果

Figure 1. The CO2 fragment (901 bp) gained by glass-milk combined PCR method. Lane 1: DNA marker, Lane 2~3: CO2 fragment (901 bp) gained from CHD patients, Lane 4~7: CO2 fragment (901 bp) gained from the normal.

2.2 冠心病患者 CO2 片段的缺失和重排

从图 2(Figure 2)发现,6 例冠心病患者和 20 例正常老年人都出现了 280 bp 的主带。由于利用第一次扩增产物(901 bp)作为 PCR 模板,因此在第二次扩增时,901 bp 的模板片段也可能出现了微量的扩增。除此之外,在冠心病患者中还出现了 100 bp 的扩增片段,其中 1 例患者还出现了 450 bp 或 600 bp 的扩增片段。通过斑点杂交表明 100 bp 和 600 bp 的扩增产物为线粒体 DNA,而 450 bp 的扩增产物通过序列分析和比较发现位于人核基因组的 12q24 染色体上(结果另行发表)。这意味着冠心病患者中的 CO2 基因都存在片段的缺失(Lane 2、4)或插入(Lane 3)的重排现象。

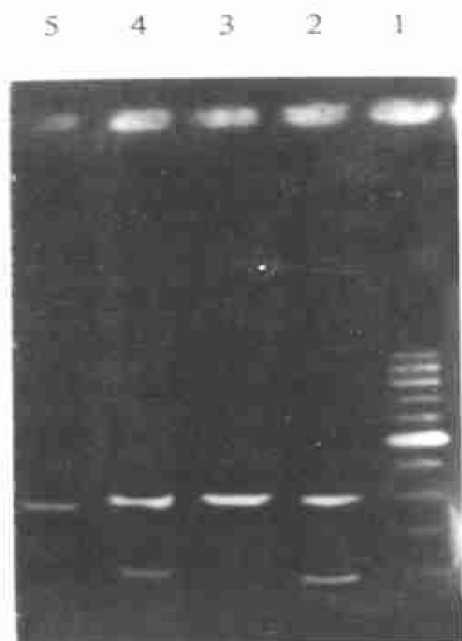


图 2. 冠心病患者 CO₂ 片段的重排

Figure 2. Rearrangement of CO₂ gene gained by nest PCR.

Lane 1: 100 bp ladder, Lane 2~ 4: Nested CO₂ fragment gained from CHD patients, Lane 5: Nested CO₂ fragment gained from the normal.

3 讨论

线粒体 DNA 的氧化损伤是引起动脉硬化的主要影响因素之一,其主要作用表现在改变细胞内 ATP 的合成和 Ca²⁺ 浓度动态平衡^[7,8]。在冠心病组织中,由于线粒体内产生过量的氧自由基,引起线粒体 DNA 的氧化损伤,mtDNA 的损伤与编码氧化磷酸化体系的核基因的表达受损相关联,其损伤后果将导致线粒体呼吸功能受损,使 ATP 的合成和 Ca²⁺ 动态平衡受到破坏,进一步引起线粒体功能受损,这表明线粒体及线粒体 DNA 损伤在心脏病中起重要作用。

细胞色素 C 氧化酶是线粒体呼吸链的关键酶,CO₁ 是细胞色素 C 氧化酶的活性中心,其活性的改变导致线粒体呼吸链的电子传递受阻,并将电子泄漏于线粒体基质内,使超氧阴离子产生增多,导致线粒体内的氧应激水平提高。mtDNA 有多种多样的缺失类型,包括点突变和缺失、插入的重排^[9]。1995 年 Juretic^[6] 利用 PCR 技术发现了 COI 和 CO₂

基因的重排现象,同时包含有 mtDNA 的缺失和插入。本文利用半巢式 PCR 首次证实,在冠心病患者中 CO₂ 基因也存在片段缺失的重排现象;另外,其中一位冠心病患者线粒体 DNA 损伤比较严重,除了出现 CO₂ 基因片段的缺失和插入增加外,还存在线粒体 DNA 模板量的大量减少,导致引物匹配程度较低、拷贝数较少的核基因片段大量扩增。这表明在冠心病的生成过程中,存在着线粒体 CO₂ 基因的片段缺失和模板量减少的现象。CO₂ 基因的片段缺失和复制水平下降与整体水平的心脏功能受损之间有着一定相关性,更为确凿的证据有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Remes AM, Hesinen IE, Ikheimo MJ, et al. Mitochondrial DNA deletions in dilated cardiomyopathy: a clinical study employing endomyocardial sampling [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1994, **23**: 935- 942
- [2] Tanaka M, Gong J, Zhang J, et al. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000, **116**(2- 3): 65- 76
- [3] Corral- Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, et al. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease [J]. *Mutat Res*, 1992, **275**(3- 6): 169- 180
- [4] Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Ischemic Heart Disease. Report of the joint international society and federation of cardiology/WHO Task Force on standardization of clinical nomenclature [J]. *Circulation*, 1979, **59**: 607- 609
- [5] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, **290**: 457- 465
- [6] Juretic N. Mitochondrial DNA rearrangements: intracellular information system [J]. *FEBS Lett*, 1995, **362**(3): 337- 341
- [7] Ferrari RJ. The role of mitochondria in ischemic heart disease [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 1996, **28**(Suppl 1): S1- 10
- [8] Luft R. The development of mitochondrial medicine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(19): 8 731- 738
- [9] Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, et al. Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease [J]. *Circulation*, 1999, **100**(22): 2 244- 247

(此文 2000- 10- 08 收到, 2001- 04- 16 修回)

(此文编辑 朱雯霞)