

# 三七皂甙 Rg1、Rb1 对肝纤维化大鼠线粒体 DNA 三磷酸腺苷酶 6、8 亚基的作用机制研究

李剑瑜 刘鹏年 张霞 穆启梅 柳伟 刘强 武凡

**【摘要】 目的** 探讨三七皂甙(panax notoginseng saponins, PnS) Rg1、PnS Rb1 干预下,肝纤维化大鼠线粒体 DNA 三磷酸腺苷(adenine triphosphate, ATP)酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基的基因突变和 ATP 含量变化。**方法** 96 只 Wistar 大鼠分为对照组、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)肝纤维化大鼠模型组、PnS Rg1 组、PnS Rb1 组各 24 只。除对照组外,其余 3 组用 5% CCl<sub>4</sub> 橄榄油按 5 ml/kg 灌胃制作肝纤维化大鼠模型。PnS Rg1 组在每次 CCl<sub>4</sub> 灌胃同时腹腔注射 PnSRg1 (5 mg/kg)。PnS Rb1 组在每次 CCl<sub>4</sub> 灌胃同时腹腔注射 Rb1 (5 mg/kg)。用生物发光法测定各组大鼠实验前及实验开始 2、4、6 周末时线粒体内 ATP 含量并比较。提取肝细胞线粒体总 RNA, 逆转录为互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA), 用基因重组、测序, 通过 GenBank 与线粒体 DNA 已知序列进行比较, 研究 PnS Rg1、PnS Rb1 干预 6 周后线粒体 DNA 的 ATP 酶 6 亚基 7904-8584 区域和 ATP 酶 8 亚基 7743-7946 区域基因突变情况。**结果** (1) 与对照组相比, 模型组大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基 7904-8584 区域有 3 处突变: C8294G、T8505G、G8584A。用 Fisher 确切概率法分析, 突变增加有显著性意义( $P < 0.01$ )。PnS Rg1 组、PnS Rb1 组与对照组相比突变增加没有显著性意义( $P > 0.05$ )。(2) 与对照组相比, ATP 酶 8 亚基 7743-7946 区域有 2 处突变: A7797non、T7863C。用 Fisher 确切概率法分析, 突变增加有显著性意义( $P < 0.01$ )。PnS Rg1、Rb1 组与对照组相比突变增加没有显著性意义( $P > 0.05$ )。(3) 各组肝纤维化大鼠线粒体 ATP 含量与 CCl<sub>4</sub> 处理时间的相关性分析, 用 pearson's 检验  $r = -0.935$ , 呈负相关。(4) 肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6 亚基突变的相关性分析, 用 pearson's 检验  $r = -0.943$ , 呈负相关; 肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 8 亚基突变的相关性分析, 用 pearson's 检验  $r = -0.961$ , 呈负相关。**结论** PnS Rg1、Rb1 可以显著抑制线粒体 ATP 含量下降, 可以显著抑制线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基突变, 从而推断 PnS Rg1、Rb1 可能通过减少线粒体 DNA ATP 酶 6、8 亚基突变而抑制线粒体 ATP 含量下降, 从而延缓肝纤维化发生发展。

**【关键词】** 肝纤维化; 线粒体; 三磷酸腺苷酶 6 亚基; 三磷酸腺苷酶 8 亚基; 三七皂甙 Rg1; 三七皂甙 Rb1; Wistar 大鼠

**【中图分类号】** **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.08.003

**Study on the mitochondrial mtDNA ATPase6、8 gene mutation and on the function mechanism of panax notoginseng saponins Rg1、Rb1 for hepatic fibrosis rats** LI Jian-yu, LIU Peng-nian, ZHANG Xia, et al. Blood Transfusion Department of Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou 072750, China  
Corresponding author: WU Fan, E-mail: wufanfan49@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the changes of the mitochondrial DNA (mt DNA) adenine triphospholibase(ATPase)6 gene, ATPase 8 gene mutation under the intervention of panax notoginseng saponins(PnS)Rg1, PnS Rb1 for hepatic fibrosis rats which may have theoretical sense in the prevention and cure hepatic fibrosis. **Methods** 96 Wistar rats divided into contrast group, carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) group, liver fibrosis rats model group, PnS Rg1 group and PnS Rb1 group, with 24 rats in each

作者单位:072750 河北省涿州市医院输血科(李剑瑜、刘鹏年、张霞、穆启梅、柳伟、刘强), 检验科(武凡)

作者简介:李剑瑜(1973-),女,本科,副主任技师。研究方向:临床检验。E-mail:ljl797@163.com

通讯作者:武凡(1949-),女,博士,教授。研究方向:细胞损伤与抗损伤。E-mail:wufanfan49@163.com

group. Except contrast group, other three groups were reproduced by repeated injection 5%  $\text{CCl}_4$  solution in rats into liver fibrosis rats model. PnS Rg1 group were also injected 5 ml/kg, PnS Rb1 group were injected 5 ml/kg, and at the same time given 5%  $\text{CCl}_4$  solution. Extract RNA of hepatic mitochondrial and reverse transcription complementary DNA (cDNA). Gene-recommended and sequencing have been researched. Then further study the PnS Rg1 group, PnS Rb1 group ATPase 6 gene 7904-8584 region and ATPase 8 gene 7743-7946 region gene mutation after 6 weeks. Biological fluorescent method detect ATP content. **Results** (1) Compare with the contrast group, gene analysis of mtDNA ATPase 6 in hepatic fibrosis of model group rats showed that there were three mutation sites: C8294G, T8505G, C8584A. Using Fisher's exact test to analyze, mutations have increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compare with the contrast group, PnS Rg1 group, PnS Rb1 group mutation increasing does not have marked sense ( $P > 0.05$ ). (2) Compare with the contrast group, the gene analysis of mtDNA ATPase 8 were two mutation sites: A7797non, T7863C. Using Fisher's exact test to analyze, mutations have increased significantly ( $P < 0.01$ ). (3) Liver fibrosis rats mitochondrial DNA ATP of each group with  $\text{CCl}_4$  manage time correlation analysis, undergoing pearson's test  $r = -0.935$  negative correlation. (4) Liver fibrosis rats mitochondrial DNA ATP of each group with ATPase6 gene mutation has correlation analysis, undergoing pearson's test  $r = -0.943$  negative correlation. Liver fibrosis rats mitochondrial DNA ATP of each group with ATPase8 gene mutation has correlation analysis, undergoing pearson's test  $r = -0.961$  negative correlation. **Conclusion** The mutation of mtDNA ATPase 6 gene and ATPase 8 gene may be responsible for hepatic fibrosis development. PnS Rg1, PnS Rb1 were protective function remarkably for the mitochondrial of hepatic fibrosis rats through inhibition of mtDNA ATPase 6 gene, ATPase 8 gene mutation rate. Therefore delay hepatic fibrosis development.

**【Key words】** Hepatic fibrosis; Mitochondria DNA; Adenosine triphosphatase 6 gene; Adenosine triphosphatase 8 gene; Panax notoginseng saponins Rg1; Panax notoginseng saponins Rb1; Wistar rat

肝纤维化是很多慢性肝病的共同病理过程。Arduini<sup>[1]</sup>认为肝脏线粒体突变可导致线粒体功能下降,肝纤维化发病可能与此相关。Banasch<sup>[2]</sup>提出肝脏线粒体氧化磷酸化功能改变是影响肝纤维化发生发展的重要因素。这些重要发现为深入研究肝纤维化机制和开拓新治疗方案带来机遇。线粒体 DNA 三磷酸腺苷(adenine triphosphate, ATP)酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基基因突变与肝纤维化致病的相关性越来越受关注。另外线粒体突变所影响和导致的疾病目前尚无根治方法,基因治疗虽带来希望,但由于这些基因片段本身存在细胞通透性、细胞毒性等方面的问题,因此尚未有治疗的突破性进展<sup>[3]</sup>。本课题探讨肝纤维化与线粒体突变的时相性关系及突变与 ATP 含量的关系,并运用逆向思维,从疗效入手,从在临床已经使用的药物入手,来寻找防治肝脏线粒体突变的抑制剂。课题组调查对比了运用中医“活血化瘀、清热解毒”理论治疗肝纤维化初见疗效的药物,选用三七皂甙(panax notoginseng saponins, PnS)Rg1、PnS Rb1 作为研究对象。通过探讨其对四氯化碳(carbon tetrachloride,  $\text{CCl}_4$ )诱导的肝纤维化大鼠 ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基基因突变的影响和线粒体内 ATP 的影响,为 PnS

Rg1、PnS Rb1 在肝纤维化上的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康雄性体重( $250 \pm 20$ )g Wistar 大鼠购自河北医科大学实验动物中心,合格证号:冀医动字第 04056 号。

### 1.2 试剂

PnS Rg1、PnS Rb1 购自昆明植物研究所。4-羟乙基哌嗪乙磺酸(hepes)、IV 型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂、细胞分离液(Percoll)均购于 Sigma 公司。引物由上海博亚生物公司设计合成。成髓细胞白血病病毒(AMV)逆转录酶、核糖核酸酶(RNase)抑制剂、Taq DNA 聚合酶、PUCm-T 质粒、PstI 内切酶购自 Promega 公司。质粒快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物技术有限公司。ATP 试剂盒购于 Beckman Coulter 公司。引物由上海博亚生物公司设计合成。

### 1.3 动物造模与分组

Wistar 大鼠 96 只,随机分为 4 组,每组 24 只。对照组 PBS 灌胃 5 天。 $\text{CCl}_4$  肝纤维化动物模型组(简称模型组)用 5%  $\text{CCl}_4$  橄榄油按 5 ml/kg 灌胃,每 3 天 1 次,共 15 次。PnS Rg1 组在每次  $\text{CCl}_4$  灌胃

同时腹腔注射 Rgl 5 mg/kg。PnS Rb1 组在每次 CCl<sub>4</sub> 灌胃同时腹腔注射 Rb1 5 mg/kg。

各组均以普通饲料喂养,配以 5% 酒精饮用水。

1.4 标本采集与检测

1.4.1 线粒体 ATP 含量改变的检测 各组于实验前、实验开始 2、4、6 周后每次断头处死 6 只大鼠,取新鲜肝组织,收集线粒体,用生物发光法测定各组大鼠实验前及实验开始 2、4、6 周时线粒体内 ATP 的含量并比较。

1.4.2 线粒体 DNA 的提取及基因克隆测序 同时进行肝细胞线粒体 RNA 的分离提取,逆转录为 cDNA 用于线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基基因序列检测。参照文献将提取的大鼠肝细胞线粒体 DNA 进行 PCR 特异扩增 ATP 酶 6 基因,将其与 PUCm-T 质粒重组,转入 E. coli JM109 (大肠杆菌)、PstI 酶切、纯化后送往上海博亚生物公司测序,将其结果经基因库查询,与 Rattus norvegicus (wistar 大鼠) 线粒体基因比较分析<sup>[4]</sup>。大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基 7904-8584 区域和 ATP 酶 8 亚基 7743-7946 区域基因序列检测结果报告,通过 gene Bank 与线粒体 DNA 已知序列进行比较,研究线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基基因的改变。

1.4.3 检测线粒体 DNA ATP 酶基因 mRNA 表达

参照文献提取出总 RNA,逆转录为 cDNA,PCR 特异扩增,将产物置于 1.2% 琼脂糖凝胶电压 50 V、30 分钟进行电泳<sup>[5]</sup>,检测线粒体 DNA ATP 酶基因 mRNA 表达。

ATP 酶 6 基因的引物为:5'-AAACGAATAAC-CCTTGAGAATC-3' [1A (bp7879)],5'-TGGTGGGT-CATTATGTGTTATC-3' [1B (bp8594C)]。扩增片段为 715bp。ATP 酶 8 基因的引物为 5'-ACAATGA-CATGCCACAAC-3',5'-GGGAACATAATAATGGT-CAC-3'。扩增片段为 248bp。 $\beta$ -actin 基因的引物为:5'-AAATCGTCGGTGACATCAAA-3' ( $\beta$ 1),5'-ATCG-TACTCGTGCTTGCTGA-3' ( $\beta$ 2)。扩增片段为 270bp。

1.5 统计学分析

统计软件为 SPSS 17.0 统计软件包。突变率的比较用 R×C 表资料的 Fisher 确切概率法。线粒体 ATP 的含量与 CCl<sub>4</sub> 处理时间的相关性分析用 pearson 相关性检验(pearson's r test)。线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6、8 亚基突变的相关性分析用 pearson 相关性检验。数据资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,并经正态性检验及方差齐性检验。

2 结果

2.1 基因序列检测结果

6 周末大鼠线粒体 DNA 7904-8584 区域 ATP 酶 6 亚基有 3 处突变:C8294G,T8505G,G8584A。6 只大鼠共 18 个可能突变处,模型组大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基 7743-7946 区域基因发生突变的为 88.8%,PnS Rgl 组大鼠发生突变率为 27.8%,PnS Rb1 组大鼠发生突变率为 33.3%。经列联表的 Fisher 确切概率法检验,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基基因序列检测结果见表 1。

表 1 各组大鼠线粒体 DNA 7904-8584 区域 ATP 酶 6 亚基基因突变情况(只,n=6)

组别	C8294G (130 CAA→GAA)	T8505G (200 GTA→GGA)	G8584A (226 Ala→Thr)	总突变率
对照组	0	0	0	0%
模型组	6	5	5	88.8%
PnS Rgl 组	2	1	2	27.8%
PnS Rb1 组	2	2	2	33.3%

6 周末大鼠线粒体 DNA 7743-7946 区域 ATP 酶 8 亚基有 2 处突变:A7797 non(缺失突变),T7863C。6 只大鼠共 12 个可能突变处,模型组大鼠线粒体 DNA ATP 酶 8 亚基 7743-7946 区域基因突变率为 91.6%,PnS Rgl 组大鼠发生突变率为 25.0%,PnS Rb1 组大鼠发生突变率为 33.3%。经列联表的 Fisher 确切概率法检验,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。大鼠线粒体 DNA ATP 酶 8 亚基基因序列检测见表 2。PnS Rgl 组、PnS Rb1 组与对照组相比突变增加没有显著性意义, $P > 0.05$ 。

表 2 各组大鼠线粒体 DNA 7743-7946 区域 ATP 酶 8 亚基基因突变情况(只,n=6)

组别	A7797non (缺失突变)	T7863C (41 Thr→Ala)	总突变率
对照组	0	0	0%
模型组	5	6	91.6%
PnS Rgl 组	2	1	25.0%
PnS Rb1 组	2	2	33.3%

2.2 线粒体 ATP 的含量与 CCl<sub>4</sub> 处理时间的相关性分析

检测各组大鼠在肝纤维化形成过程中各时相点 ATP 的含量,见表 3,并作单因素多组间方差分析。与对照组相比,模型组在第 2 周末开始下降,差异无统计学意义;第 4 周末下降明显,差异有统计学意义

( $P < 0.05$ ), 第 6 周下降更加显著( $P < 0.01$ )。

PnS Rgl 组、PnS Rbl 组在第 2 周末 ATP 的含量略高于模型组, 差异无统计学意义; 第 4 周末模型组 ATP 的含量下降明显, PnS Rgl 组、PnS Rbl 组 ATP 的含量均下降较慢, 这两组 ATP 的含量均高于模型组, 经单因素多组间方差分析, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。第 6 周末这种差异更加显著( $P < 0.01$ )。

用 pearson's 检验  $r = -0.935$ , 各组大鼠在肝纤维化各时相点 ATP 的含量, 与对照组相比, 呈负相关。

表 3 各组大鼠线粒体 ATP 的含量与  $\text{CCl}_4$  处理时间的相关性分析 ( $\mu\text{mol/g}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	实验前	实验 2 周后	实验 4 周后	实验 6 周后
对照组	3.8 ± 0.72	4.02 ± 0.82	3.78 ± 0.85	3.88 ± 0.76
模型组	4.1 ± 0.83	3.15 ± 0.65	1.95 ± 0.47 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.25 <sup>b</sup>
PnS Rgl 组	3.9 ± 0.77	3.34 ± 0.61	3.12 ± 0.51 <sup>ac</sup>	2.71 ± 0.41 <sup>bd</sup>
PnS Rbl 组	3.72 ± 0.69	3.15 ± 0.73	2.91 ± 0.54 <sup>ac</sup>	2.43 ± 0.51 <sup>ac</sup>

注: 与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$

### 2.3 肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6 亚基, ATP 酶 8 亚基突变的相关性

大鼠线粒体 DNA 7904-8584 区域 ATP 酶 6 亚基有 3 个突变点, 理论上 6 只大鼠有 18 个突变点, 为分母; 2、4、6 周末实际的突变数为分子。同理大鼠线粒体 DNA 7743-7946 区域 ATP 酶 8 亚基的突变点为 2 个, 6 只大鼠理论上突变点为 12 个, 为分母), 2、4、6 周末实际的突变数为分子。

分析肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6 亚基突变的相关性, 经 pearson's 检验,  $r = -0.943$ ,  $P < 0.01$ ; 分析肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 8 亚基突变的相关性, 经 pearson's 检验,  $r = -0.961$ ,  $P < 0.01$ 。肝纤维化大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基突变呈负相关。见表 4。

表 4 各组大鼠线粒体内 ATP 含量与 ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基突变的相关性分析

处理时间	ATP ( $\mu\text{mol/g}$ )	ATP 酶 6 亚基突变率	ATP 酶 8 亚基突变率
实验前	4.1 ± 0.83	0	0
实验 2 周后	3.15 ± 0.65	22.2% (4/18)	25.0% (3/12)
实验 4 周后	1.95 ± 0.47	66.7% (12/18)	66.7% (8/12)
实验 6 周后	1.20 ± 0.25	88.9% (16/18)	91.7% (11/12)

## 3 讨论

### 3.1 肝纤维化大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基、ATP 酶 8 亚基基因序列检测结果的意义

线粒体是能量转换的细胞器, 具有相对独立的

遗传系统和生物合成机构, 能产生能量, 促进新陈代谢、掌管细胞死亡和其它重要的信号旁路。线粒体 DNA 通常与线粒体内膜结合, 周围无组蛋白保护, 处在高氧化还原状态中, 而且聚合酶  $\gamma$  不具有“校读”作用, 缺乏修复机制, 易受毒性物质攻击, 其突变率比核 DNA 高 5 ~ 17 倍<sup>[5]</sup>, 已发现多种线粒体 DNA 突变所致疾病。

Uusimaa<sup>[6]</sup>报道检测三个未检出有遗传背景的儿童患有 Alpers-Huttenlocher-like progressive cerebro hepatic dise, 通过检测线粒体 DNA 探寻线粒体 DNA 缺失与线粒体呼吸链缺失的关系。结果证明 G352A, C269T 的突变与肝损伤有关。本试验支持 Uusimaa 的观点。模型组大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6 亚基有 3 处突变 C8294G, T8505G, G8584A。3 处突变导致所编码的氨基酸的改变: C8294G 使 130 位氨基酸由谷氨酰胺变为谷氨酸, 使中性氨基酸变为酸性氨基酸; T8505G 使 200 氨基酸由缬氨酸变为甘氨酸; G8584A 使 226 位氨基酸由丙氨酸变为苏氨酸。它能显著地影响呼吸链 V 的结构, 减低它的活性。ATP 合酶即呼吸链 V 主要由  $\text{F}_0\text{F}_1$  组成, ATP 酶 6、8 亚基基因是编码  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP 酶疏水部分  $\text{F}_0$  的两个基因。 $\text{F}_0$  是质子通道, 当  $\text{H}^+$  顺浓度经  $\text{F}_0$  回流时, 催化 ADP 和  $\text{P}_i$  生成并释放 ATP。有报道 ATP 酶 6 亚基基因 T8993G 突变达到一定阈值时导致 Leigh 病<sup>[7]</sup>, 该突变引起 ATP 产量减少并引起  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP 酶结构的不稳定<sup>[8]</sup>。

大鼠线粒体 DNA 7743-7946 区域 ATP 酶 8 亚基基因序列检测结果报告: ATP 酶 8 亚基有 2 处突变 A7797 non, T7863C。41 位苏氨酸变成丙氨酸。ATP 酶 8 基因 7797 位点碱基 A 的缺失, 使阅读框架改变, 转录条件改变并受阻, 是 ATP 酶 8 mRNA 表达下调的主要原因, 此位点的缺失突变与研究组前期在失血性休克肠上皮细胞 ATP 酶 8 mRNA 的发现改变相同<sup>[9]</sup>。结果提示缺血及  $\text{CCl}_4$  等毒性物质的攻击都能导致 A7797 non 的缺失突变。ATP 酶 6、8 基因的突变将导致 ATP 酶合成减低, 由此导致线粒体功能障碍。高等动物线粒体 DNA 是共价闭合双链 DNA, 编码 13 条多肽, 与核 DNA 共同参与氧化磷酸化。因此任何线粒体 DNA 区域的突变将改变能量的产生。线粒体 DNA 点突变的产生, 提高了 DNA 双链的分离机会, 促使线粒体 DNA 发生进一步突变, 如缺失和重排。缺失的线粒体 DNA 片断, 既可能形成细胞内的小环, 也可能在线粒体 DNA 或

nDNA 上造成重排,造成更严重的损伤<sup>[10]</sup>。

线粒体突变所影响和导致的疾病目前尚无根本有效的治疗方法,基因治疗带来了希望,包括基因转换,线粒体转染,同种异性基因表达和限制性内切酶纠正线粒体 DNA 的突变等,但由于这些基因片段本身存在细胞通透性,细胞毒性,代谢稳定性等方面的问题,因此临床应用尚未有突破性进展<sup>[3]</sup>。本课题运用逆向思维,从疗效入手,从在临床已经使用的药物入手,来寻找防治肝脏线粒体突变的抑制剂。课题组调查对比了运用中医“活血化瘀,清热解毒”理论治疗肝硬化初见疗效的药物,选用 PnS Rg1、PnS Rb1 作为研究对象。

PnS Rg1、PnS Rb1 显著抑制肝硬化大鼠 ATP 酶 6 亚基、8 亚基的突变,与模型组大鼠相比,PnS Rg1 组突变率、PnS Rb1 组突变率均大幅下降。

### 3.2 各组肝硬化大鼠线粒体 ATP 含量改变意义

检测各组大鼠在肝硬化形成过程中各时相点 ATP 的含量,与对照组相比,模型组在第二周明显下降,第四周就有明显差异( $P < 0.01$ )。

ATP 酶 6、8 基因的突变将导致 ATP 酶合成减低,ATP 含量下降,由此导致线粒体功能障碍。高等动物线粒体 DNA 是共价闭合双链 DNA,编码 13 条多肽,与核 DNA 共同参与氧化磷酸化。因此任何线粒体 DNA 区域的突变将改变能量 ATP 的产生<sup>[11]</sup>。而 ATP 酶 8 基因 7797 位点碱基 A 的缺失,使阅读框架改变,转录条件改变并受阻,是 ATP 酶 6、8 mRNA 下调的主要原因。线粒体 DNA 点突变的产生,提高了 DNA 双链的分离机会,促使线粒体 DNA 发生进一步突变,如缺失和重排。缺失的线粒体 DNA 片断,既可能形成细胞内的小环,也可能在线粒体 DNA 或 nDNA 上造成重排,造成更严重的损伤<sup>[11]</sup>。线粒体内的缺失突变达到一定域值后并继续上升,使 ATP 酶活性迅速下降。ATP 含量下降,能量供应不足,细胞质不能输入并补充线粒体转录翻译所需成分,此时转录出的 ATP 酶 6、8mRNA 的质和量会进一步下调。

ATP 含量与对照组相比,模型组在第二周明显下降,第四周就有明显差异( $P < 0.05$ ),第六周有显著性差异( $P < 0.01$ )。ATP 酶 6、8 亚基的突变与 ATP 含量呈明显负相关的趋势,而对照组无改变。

ATP 含量的下降,肝细胞内缺乏维持细胞进行正常生理功能的能力,致使肝细胞发生炎症、坏死、增生,诱导肝纤维化的发生。

由此可见肝硬化大鼠线粒体 DNA ATP 酶 6、8 基因突变以及 ATP 含量下降是导致肝纤维化的重要原因之一。PnS Rg1、Rb1 通过减少线粒体 DNA ATP 酶 6、8 亚基突变而防治肝硬化发生发展。

### 参 考 文 献

- [1] Arduini A, Serviddio G, Escobar J, et al. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(1): 119-27.
- [2] Banasch M, Ellrichmann M, Tannapfel A, et al. The non-invasive (13)C-methionine breath test detects hepatic mitochondrial dysfunction as a marker of disease activity in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Eur J Med Res, 2011, 16(6): 258-64.
- [3] Williams EJ, Benyon RC, Trim N, et al. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo[J]. Gut, 2001, 49(4): 577-583.
- [4] Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, et al. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence[J]. J Hepatol, 2012, 57(2): 330-336.
- [5] Mancuso M, Ferraris S, Pancrudo J, et al. New DGK gene mutations in the hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome[J]. Arch Neurol, 2005, 62(5): 745-747.
- [6] Uusimaa J, Finnilä S, Vainionpää L, et al. A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease[J]. Pediatrics, 2003, 111(3): e262-268.
- [7] Fukushima S, Honda K, Awane M, et al. The frequency of 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA in various types of liver disease and in normal liver[J]. Hepatology, 1995, 21(6): 1547-51.
- [8] Levéen P, Kotarsky H, Mörgelin M, et al. The GRACILE mutation introduced into Bcs1l causes postnatal complex III deficiency: a viable mouse model for mitochondrial hepatopathy[J]. Hepatology, 2011, 53(2): 437-447.
- [9] Mancuso M, Ferraris S, Pancrudo J, et al. New DGK gene mutations in the hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome[J]. Arch Neurol, 2005, 62(5): 745-747.
- [10] McDonald DG, McMenamin JB, Farrell MA, et al. Familial childhood onset neuropathy and cirrhosis with the 4977bp mitochondrial DNA deletion[J]. Am J Med Genet, 2002, 111(2): 191-194.
- [11] Massoud Houshmand, Sadaf Kasraie, Solmaz Etemad Ahari, et al. Investigation of tRNA<sup>Lys/Leu</sup> and ATPase 6/8 gene mutations in Iranian ataxia telangiectasia patients[J]. Arch Med Sci, 2011, 7(3): 523-527.

(收稿日期:2014-05-12)

(本文编辑:张磊)