

- China establish a new genotype[J]. Vaccine, 1998, 16(7):281-285
- 6 马绍辉, 张蓉松, 刘龙丁, 等. 腮腺炎病毒分离株(SP株)SH基因及其旁侧序列的初步分析[J]. 微生物与感染, 2006, 1(2):87-90
 - 7 Cortese MM, Barskey AE, Tegtmeier GE, *et al.* Mumps antibody levels among students before a mumps outbreak: in search of a correlate of immunity[J]. J Infection Diseases, 2011, 204(1):1413-1422
 - 8 Rubin SA, Link MA, Sauder CJ, *et al.* Recent mumps outbreaks in vaccinated populations: no evidence of immune escape[J]. J Virol, 2012, 86(1):615-620
 - 9 史长军, 梁燕, 崔平芳, 等. 不同代次F基因型SP-A株腮腺炎病毒在恒河猴体内的致病性[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9):774-776
 - 10 Liang Y, Ma SH, Liu LD, *et al.* Identification and development of a promising novel mumps vaccine candidate strain[J]. Microbes And Infection, 2010, 12(1):1178-1187
- (收稿日期:2012-10-17)
(修回日期:2012-11-16)

MTH2 和 MTH3 蛋白在快速老化模型鼠 SAMP8 胸腺中增龄性表达的比较研究

蒙 茗 黑爱莲 姜 平 蔡剑平

摘 要 目的 检测抗核酸氧化酶蛋白 MTH2 和 MTH3 在快速老化小鼠 SAMP8 胸腺中的表达,探讨其与 SAMP8 增龄性变化的相关性。**方法** 选用 1、4、8、12 月龄的 SAMP8 小鼠及同龄的抗快速老化小鼠 R1 (SAMR1)作为实验对象。采用免疫印迹法检测胸腺中 MTH2 和 MTH3 蛋白的表达。**结果** 免疫印迹结果显示,在 SAM 鼠胸腺中 MTH3 蛋白的表达量均显著高于 MTH2。定量结果显示,1、4、8、12 月龄的 SAMP8 胸腺中 MTH3 表达的灰度值 (grey level) 分别为 0.546、0.322、0.207、0.164,显著低于同龄 SAMR1 ($P < 0.05$),而 MTH2 在 SAMP8 和 SAMR1 胸腺中的表达却没有显著性差异 ($P > 0.05$)。与同组 1 月龄小鼠相比, MTH3 在 4、8、12 月龄的 SAMP8 鼠胸腺中的表达量分别下降 41%、62%、70%;在 SAMR1 鼠中分别下降 19%、43%、67%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 MTH2 在 SAMP8 和 SAMR1 胸腺中的表达也存在相同的增龄性下降的变化趋势 ($P < 0.05$)。**结论** MTH2 和 MTH3 蛋白在 SAMP8 和 SAMR1 小鼠胸腺中的表达量均呈增龄性下降,提示 MTH2 和 MTH3 蛋白表达量的减少在 SAM 鼠胸腺的衰老过程中具有重要意义,其中 MTH3 蛋白表达量的减少可能与 SAMP8 小鼠胸腺的快速衰老密切相关。

关键词 MTH2 蛋白 MTH3 蛋白 SAMP8 胸腺 增龄性变化

Change of MTH2 and MTH3 Expression with Aging in Thymus of Senescence - accelerated Mouse P8. Meng Ming, Hei Ailian, Jiang Ping, Cai Jianping. Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract Objective To detect the expression of anti-nucleic acid oxidase MTH2 and MTH3 in the thymus of senescence - accelerated mouse P8 (SAMP8). **Methods** We randomly selected SAMP8 and its control strain SAMR1 aged 1-, 4-, 8- and 12-month and performed western blot analysis to observe the expression of MTH2 and MTH3 in thymuses of the two groups of mice. **Results** The results of Western blot showed that the expression of MTH3 in thymuses of SAM mice were significantly higher than MTH2. Meanwhile, the quantitative results showed that the grey values of MTH3 expression were 0.546, 0.322, 0.207 and 0.164 in thymuses of 1-12 months-old SAMP8 mice, and significantly lower than those in the age-matched SAMR1 mice ($P < 0.05$). However, there wasn't significant difference in the expression of MTH2 in thymuses between SAMP8 and SAMR1 groups ($P > 0.05$). Compared with 1 month-old mice in the same group, the expression of MTH3 in thymuses of 4-12 months-old SAMP8 had dropped by 41%, 62% and 70% respectively. The same pattern was also observed in SAMR1 mice, and the descendent value were 19%, 43% and 67% ($P < 0.05$). The expression of MTH2 in thymuses of SAMP8 and SAMR1 had the same trend with aging ($P < 0.05$). **Conclusion** The age-related decline of MTH2 and MTH3 in thymuses of SAM mice reveals that these two proteins play an important role in the aging process of thymus, especially, the decrease of MTH3 expression may be tightly associated with the rapid thymus aging in SAMP8 mice.

Key words MTH2 protein; MTH3 protein; SAMP8; Thymus; Age-related changes

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81171028)

作者单位:100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所/卫生部老年医学重点实验室

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

快速老化小鼠 SAMP8 (senescence accelerated mice prone 8) 是目前公认的比较理想的自然衰老痴呆模型,主要以学习记忆能力减退、认知功能障碍为老化特征,其寿命较短,约为 12.1 个月^[1]。抗快速老化小鼠 SAMR1 (senescence accelerated mice resistance 1) 表现为正常衰老,作为 SAMP8 的正常对照。笔者的前期研究显示 SAMP8 快速衰老小鼠的学习记忆能力随增龄而显著下降,SAMP8 小鼠海马中的抗核酸氧化酶 MTH1 和 MTH2 蛋白的表达量也随增龄显著下降,提示抗核酸氧化酶表达量的减少与 SAMP8 小鼠海马的快速衰老相关^[2~4]。目前的研究显示,抗核酸氧化酶 MTH2 具有水解核苷酸池中的变异源性物质 8-oxo-dGTP 和 8-oxo-GTP 的生物学活性,而最近发现的 MTH3 蛋白具有水解核苷酸池中的变异源性物质 8-oxo-dGDP 和 8-oxo-GDP 的生物学活性,维持遗传信息稳定性方面发挥了非常重要的协同作用^[5,6]。胸腺是人体重要的中枢免疫器官,随着年龄的增长胸腺腺体变小、功能下降^[7]。在机体衰老的进程中,胸腺功能的衰退最为明显,因此,胸腺衰老被看作是老化过程中最重要的事件之一^[8]。本研究采用免疫印迹的方法观察了两种抗核酸氧化蛋白 MTH2、MTH3 在 SAMP8 胸腺组织中的表达,探讨了这两种抗核酸氧化蛋白的表达与 SAMP8 小鼠胸腺增龄性变化的相关性。

材料与方法

1. 材料: (1) 实验动物及分组: 本研究所用 SAMP8 及 SAMR1 品系小鼠(雄性)均由天津中医药大学第一附属医院动物中心提供。选用 1、4、8、12 月龄 SAMP8 小鼠各 3 只作为实验组,相同条件的同龄 SAMR1 小鼠作为对照组。两者均置于 SPF 环境中饲养: 24±2℃,光照/黑暗为 12h/12h,晨 7 点给光。(2) 试剂: RIPA 蛋白裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司,蛋白酶抑制剂购于 Roche 公司。兔抗鼠 β-肌动蛋白单克隆抗体(anti-β-actin)购于美国 Ameribo 公司,兔抗鼠 MTH2 多克隆抗体为本实验室自行制备并经过鉴定,兔抗人 MTH3 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体(anti-IgG-HRP)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体(anti-IgG-HRP)均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。蛋白浓度测定试剂盒(BCA)和增强型化学发光试剂盒(ECL)均购于美国皮尔森公司^[4,5]。

2. 方法: (1) 样品的准备: 将 1、4、8、12 月龄的 SAMP8、SAMR1 鼠用颈椎脱臼的方法处死,迅速取其胸腺组织并在液氮中冻存。用液氮研磨的方法收集组织粉末,并加入适量含蛋白酶抑制剂的裂解液使组织裂解,经 4℃ 12000g 离心 15min,上清液使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后加入 5×SDS 上样缓冲液 99℃ 变性 5min,蛋白变性液立即用于实验或分装后置于 -80℃ 保存。(2) 免疫印迹法检测: 将 40μg 总蛋白上样于 12% SDS-PAGE 中以 80V(浓缩胶部分)和 100V(分离胶部分)进行电泳,之后转移蛋白至 PVDF 膜上,室温封闭 2h 后用兔抗鼠 MTH2 抗体(1:1000)、兔抗人 MTH3 抗体(1:500)和兔抗鼠肌动蛋白(β-actin)抗体(1:5000)室温孵育 2.5h。用 1×TBST 充分洗涤后分别加入山羊抗兔 IgG-HRP(1:2000)和山羊抗鼠 IgG-HRP(1:2000),室温下继续孵育 1h,ECL 检测蛋白条带。(3) 免疫印迹结果检测: 用 Fluor Chem FC2 成像分析系统(protein simple,美国)对蛋白条带进行曝光,之后用 Image J 图像处理软件分析条带的灰度值。

3. 统计学方法: 将实验结果用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析法检验分析 SAMP8 或 SAMR1 各月龄组间的差异;用独立样本 t 检验分析相同月龄 SAMP8 与 SAMR1 间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTH2 蛋白在 SAMP8 和 SAMR1 小鼠胸腺组织中的表达: 利用免疫印迹法研究了 MTH2 蛋白在 1、4、8、12 月龄的 SAMP8 和 SAMR1 小鼠胸腺中的表达水平,抗鼠 MTH2 多克隆抗体可识别出大小约 20 kDa 的特异性条带(图 1)。蛋白灰度定量结果显示,与同龄 SAMR1 组小鼠比较,MTH2 在 SAMP8 胸腺中的表达无显著性差异($P > 0.05$),各组灰度值见表 1;但与同组 1 月龄小鼠相比,MTH2 在 4、8、12 月龄的 SAMP8 和 SAMR1 小鼠胸腺中的表达量均显著降低($P < 0.05$)(图 2)。该结果显示 MTH2 在 SAMP8 和 SAMR1 胸腺中的表达均呈现增龄性下降的变化趋势。

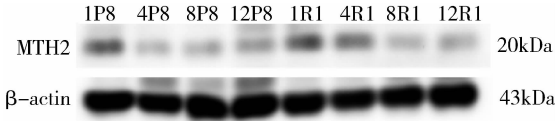


图 1 免疫印迹法检测 MTH2 在 SAMP8 和 SAMR1 鼠胸腺中的表达

1P8、4P8、8P8、12P8 分别代表 1、4、8、12 月龄的 SAMP8 鼠;1R1、4R1、8R1、12R1 分别代表 1、4、8、12 月龄 SAMR1 鼠

表 1 SAMP8 和 SAMR1 各月龄组胸腺中 MTH2 表达的定量结果

组别	鼠数(只)	灰度值			
		1 月龄	4 月龄	8 月龄	12 月龄
SAMP8	3	0.147 ± 0.011	0.107 ± 0.018 [#]	0.075 ± 0.006 [#]	0.058 ± 0.013 [#]
SAMR1	3	0.171 ± 0.021	0.117 ± 0.020 [#]	0.081 ± 0.005 [#]	0.075 ± 0.004 [#]

[#] $P < 0.05$, 与同品系 1 月龄小鼠比较有显著性差异

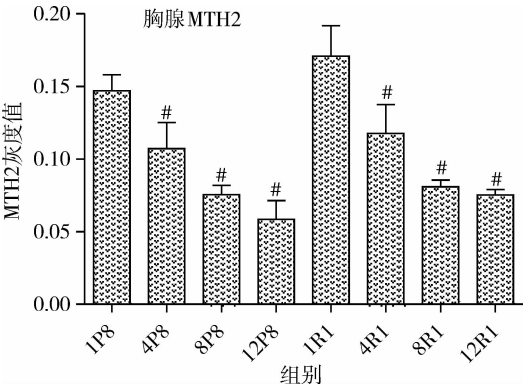


图2 MTH2在SAMP8和SAMR1鼠胸腺中的增龄性表达变化

[#] $P < 0.05$, 与同品系1月龄小鼠比较有显著性差异;1P8、4P8、8P8、12P8分别代表1、4、8、12月龄的SAMP8鼠;1R1、4R1、8R1、12R1分别代表1、4、8、12月龄SAMR1鼠

2. MTH3蛋白在SAMP8和SAMR1小鼠胸腺组织中的表达:利用免疫印迹法研究了MTH3蛋白在1、4、8、12月龄的SAMP8和SAMR1小鼠胸腺中的表达水平,兔抗人MTH3多克隆抗体可识别出大小约

35kDa的特异性条带(图3)。定量结果显示,与同龄SAMR1组小鼠比较,1、4、8、12月龄SAMP8胸腺中MTH3的表达均显著低于同龄SAMR1组($P < 0.05$),各组灰度值见表2。与同组1月龄小鼠相比,MTH3在4、8、12月龄的SAMP8和SAMR1小鼠胸腺中的表达量均显著降低($P < 0.05$)(图4)。该结果显示MTH3在SAMP8胸腺中表达显著低于SAMR1对照组,该蛋白表达的显著降低是否参与快速老化尤其是胸腺的快速老化机制将值得进一步探讨。但从增龄性变化方面,SAMP8和SAMR1胸腺中MTH3的表达均呈现增龄性下降趋势。

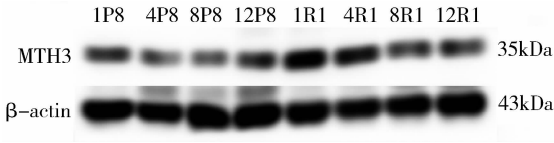


图3 免疫印迹法检测MTH3在胸腺中的表达

1P8、4P8、8P8、12P8分别代表1、4、8、12月龄的SAMP8鼠;1R1、4R1、8R1、12R1分别代表1、4、8、12月龄SAMR1鼠

表2 SAMP8和SAMR1各月龄组胸腺中MTH3表达的定量结果

组别	鼠数(只)	灰度值			
		1月龄	4月龄	8月龄	12月龄
SAMP8	3	0.546 ± 0.024	0.322 ± 0.009 [#]	0.207 ± 0.023 [#]	0.164 ± 0.009 [#]
SAMR1	3	0.757 ± 0.045 [*]	0.613 ± 0.039 ^{**}	0.431 ± 0.033 ^{**}	0.248 ± 0.020 ^{**}

与同龄SAMP8鼠比较,^{*} $P < 0.05$;与同品系1月龄小鼠比较,[#] $P < 0.05$

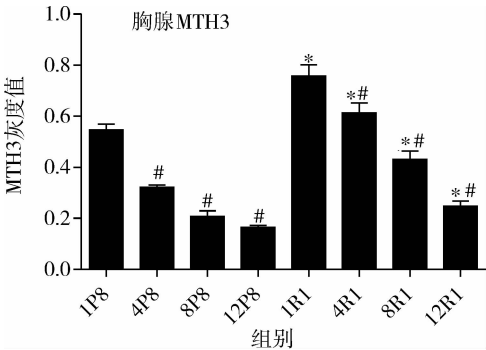


图4 MTH3在SAMP8和SAMR1鼠胸腺中的表达呈增龄性下降的变化

与同龄SAMR1鼠比较差异具有显著性,^{*} $P < 0.05$;与同品系1月龄小鼠比较有显著性差异,[#] $P < 0.05$;1P8、4P8、8P8、12P8分别代表1、4、8、12月龄的SAMP8鼠;1R1、4R1、8R1、12R1分别代表1、4、8、12月龄SAMR1鼠

3. MTH2和MTH3蛋白在SAMP8和SAMR1小鼠胸腺中的表达比较:利用免疫印迹法同时检测同一孔上样总蛋白中的MTH2和MTH3蛋白的表达,结果显示,无论在SAMP8组还是在SAMR1组,胸腺中MTH3的表达量均显著高于同时检测的MTH2表达

量($P < 0.05$),灰度定量如图5所示。

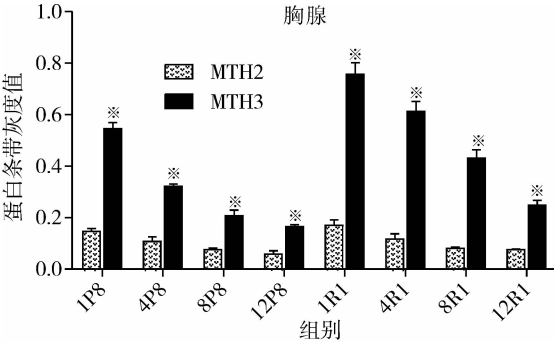


图5 MTH2、MTH3在SAMP8和SAMR1鼠胸腺中的表达情况

MTH3的表达量与MTH2的表达量比较,^{*} $P < 0.05$;1P8、4P8、8P8、12P8分别代表1、4、8、12月龄的SAMP8鼠;1R1、4R1、8R1、12R1分别代表1、4、8、12月龄SAMR1鼠

讨 论

在生理状态下哺乳动物细胞在新陈代谢过程中会持续的产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)如超氧阴离子自由基、过氧化氢和羟自由基,造成核酸、蛋白、脂质等物质的氧化损伤。目前已发现的碱

基氧化产物超过 30 多种,在所有 DNA 碱基中,鸟嘌呤(G)具有最低氧化势,最易被 ROS 氧化生成 8-羟基鸟嘌呤(8-oxo-dG),8-oxo-dG 是一种内源性诱变剂,不仅可以与 DNA 上的胞嘧啶(C)配对,还可以几乎相同效率与腺嘌呤(A)配对,在 DNA 复制过程中引起 A:T→C:G 的碱基颠换,是引起内源性 DNA 突变的重要原因^[9]。因此 8-羟基脱氧鸟苷(8-oxo-dG)被公认是评价 DNA 氧化损伤的重要标志物^[10]。Taddei 等^[11]通过对大肠杆菌 MutT 蛋白的研究发现,活性氧不仅可氧化核苷酸池中的 dGTP,还可氧化 RNA 合成的前体 rGTP。在 RNA 合成过程中,8-oxo-rGTP 通过与 DNA 模板上 A 的错误配对而掺入 RNA,产生 RNA 的变异以及变异蛋白质的产生。目前的研究结果显示哺乳动物细胞内的抗核酸氧化酶蛋白 MTH2 具有水解核苷酸池中的变异源性物质 8-oxo-dGTP 和 8-oxo-GTP 为相应的单磷酸形式的生物学活性,而最近发现的 MTH3 蛋白具有水解核苷酸池中的变异源性物质 8-oxo-dGDP 和 8-oxo-GDP 为相应的单磷酸形式的生物学活性,在维持遗传信息的稳定、抑制 DNA 变异和 RNA 变异以及变异蛋白质的产生方面发挥了非常重要的协同作用。

笔者的前期研究显示,快速老化小鼠 SAMP8 小鼠海马中的抗核酸氧化酶蛋白 MTH1 和 MTH2 蛋白的表达量随增龄显著下降,提示抗核酸氧化酶蛋白的表达量减少与 SAMP8 小鼠海马的快速衰老相关。本研究用免疫印迹的方法观察了两种抗核酸氧化蛋白 MTH2 和 MTH3 在 SAMP8 胸腺组织中的表达,探讨了这两种抗核酸氧化蛋白的表达与 SAMP8 小鼠胸腺增龄性变化的相关性。研究结果显示在 SAM 鼠胸腺中 MTH3 蛋白的表达量均显著高于 MTH2。定量结果显示,虽然 1、4、8、12 月龄的 SAMP8 胸腺中 MTH3 与 MTH2 的蛋白表达量均呈显著的增龄性下降,但是 MTH2 蛋白的表达量在 SAMP8 和 SAMR1 胸腺中的表达却没有显著性差异($P > 0.05$)。与同组 1 月龄小鼠相比,MTH3 在 4、8、12 月龄的 SAMP8 鼠胸腺中的表达量分别下降 41%、62%、70%;在 SAMR1 鼠中分别下降 19%、43%、67%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究结果显示在 SAM 鼠胸腺的衰老过程中 MTH2 和 MTH3 蛋白表达量的减少具有重要意义,而 MTH3 蛋白表达量的减少可能与 SAMP8 小鼠胸腺的快速衰老关系更密切。胸腺是人体最早衰老的器官之一,其衰老进程伴随人类一生^[12]。本研究以调查胸腺在衰老过程中抗核酸氧化蛋白的作用为研究

目的,用免疫印迹技术系统地检测了快速老化小鼠 SAMP8 和其正常对照小鼠 SAMR1 在增龄过程中胸腺抗核酸氧化蛋白表达量的变化,发现了抗核酸氧化蛋白 MTH2 和 MTH3 的表达量随 SAM 鼠的增龄呈显著性下降的趋势,本研究结果与笔者前期发现在海马组织中抗核酸氧化蛋白随 SAM 鼠的增龄呈显著性下降的研究结果一致,显示在胸腺组织中抗核酸氧化蛋白在衰老过程中起着重要作用^[3,4]。与正常对照组小鼠 SAMR1 相比,快速老化小鼠 SAMP8 胸腺组织中 MTH3 比 MTH2 表达的增龄性下降更为显著,说明 MTH3 在衰老过程中起着更重要的作用。

活性氧自由基对细胞及其生物高分子的氧化损伤被认为是衰老的分子基础,笔者的研究显示抗核酸氧化蛋白在动物个体的衰老以及脏器的衰老中发挥了重要的作用,这一领域的研究还刚刚起步,更深入的研究还在进行之中。

参考文献

- Morley JE. The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease[J]. *Biogerontol*, 2002, 3: 57-60
- 蔡剑平,黑爱莲. 快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 学习记忆能力的增龄性变化[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2005, 12: 219-222
- Song XN, Zhang LQ, Liu DG, *et al*. Oxidative damage to RNA and expression patterns of MTH1 in the hippocampi of senescence-accelerated SAMP8 mice and Alzheimer's disease patients[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8): 1558-1565
- Zheng JD, Hei AL, Zuo PP, *et al*. Age-related alterations in the expression of MTH2 in the hippocampus of the SAMP8 mouse with learning and memory deterioration[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 287(1-2): 188-196
- Cai JP, Ishibashi T, Takagi Y, *et al*. Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305: 1073-1077
- Takagi Y, Setoyama D, Riyoko Ito, *et al*. Human MTH3 (NUDT18) hydrolyzes the oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287: 21541-21549
- 郭智彬,朱喜科. 胸腺发育与衰老相关基因调控的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2011, 1: 24-27
- 宋佳乐,李丕鹏. 胸腺神经内分泌功能与衰老[J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 3: 274-276
- Maki H, Sekiguchi M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis[J]. *Nature*, 1992, 355(6357): 273-275
- Sekiguchi M. Molecular devices for high fidelity of DNA replication and gene expression[J]. *Proc Jpn Acad*, 2006, 82(8): 278-296
- Taddei F, Hayakawa H, Bouton MF, *et al*. Counter-action by mut T protein of transcriptional errors caused by oxidative damage[J]. *Science*, 1997, 278(3): 128-130
- 龚张斌,金国琴. 胸腺衰老与免疫衰老[J]. *国外医学:老年医学分册*, 2009, 7: 145-149 (收稿日期:2013-01-28)

(修回日期:2013-01-31)