

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.14.010

小鼠衰老对不同组织中亚精胺的影响*

敖英[#] 吴珠萍[#] 张杰 贝伟鑫 刘佐君[△]

(深圳大学医学院 广东 深圳 518060)

摘要 目的:本研究以模式小鼠 C57BL 为对象,研究小鼠在衰老过程中不同组织器官内源性亚精胺含量的变化。**方法:**利用高效液相色谱检测小鼠心脏和肝脏组织中亚精胺含量,进一步应用 qRT-PCR 以及 Western blot 检测在衰老过程中,不同组织器官中亚精胺生物合成途径的关键基因表达变化,利用亚精胺处理细胞检测 DNA 损伤应答能力。**结果:**随着衰老的发生心脏(199.09 ± 17.12)和肝脏组织(168.92 ± 5.12)中亚精胺含量显著降低,分别为 78.01 ± 13.52 、 62.05 ± 6.73 ,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同组织器官中亚精胺生物合成途径的关键基因 Odc、Srm、Amd1 的表达随衰老的发生明显下调,并且伴随着 DNA 损伤应答障碍;利用亚精胺处理细胞,能够增强细胞对 DNA 损伤的应答反应。**结论:**衰老的小鼠中内源性亚精胺含量降低,并且其合成途径的关键基因转录水平降低,导致细胞对 DNA 损伤应答能力减弱,从而加速机体衰老进程。

关键词:亚精胺;高效液相色谱;生物合成;DNA 损伤应答;衰老

中图分类号:Q95-3;Q419 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)14-2652-05

Effects of Senescence on Endogenous Spermidine in Different Tissues of Mice*

AO Ying[#], WU Zhu-ping[#], ZHANG Jie, BEI Wei-xin, LIU Zuo-jun[△]

(Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong, 518060, China)

ABSTRACT Objective: In this study, we examined the effects of senescence on endogenous spermidine of mice by model C57BL. **Methods:** The content of endogenous spermidine in heart and liver tissues was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The expression pattern of key regulator genes in synthesis and metabolic pathways of spermine and DNA damage response was observed by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results:** The results showed that the contents of spermidine in heart and liver were decreased from 199.09 ± 17.12 and 168.92 ± 5.12 to 78.01 ± 13.52 and 62.05 ± 6.73 , respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Further, qRT-PCR and Western blot have showed that the expression of key regulator genes in synthesis and metabolic pathways of spermine was were significantly down-regulated in different tissues at the process of senescence, and accompanied by DNA damage response impaired. **Conclusions:** With the occurrence of aging, endogenous spermidine was decreased, and the transcription level of key genes in synthesis and metabolic pathways were down-regulated, leading to DNA damage respond impaired and accelerated aging.

Key words: Spermidine; High performance liquid chromatography; Biosynthesis pathway; DNA damage response; Be senile

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q419 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)14-2652-05

前言

最新研究发现,多胺类物质如亚精胺(spermidine)可通过激活自噬参与调控衰老^[1,2]。在果蝇的实验中,亚精胺通过增加细胞的自噬能力促进果蝇长寿^[1]。同时在小鼠早期 4 个月或晚期 18 个月利用亚精胺饲喂,可以激活自噬改善心脏功,显著延长小鼠的寿命^[1,3]。但目前探究机体在衰老过程中内源性亚精胺的水平变化和合成情况,以及探究亚精胺影响衰老的机制鲜见报道。最近研究指出在人成纤维细胞中亚精胺可以激活 ATM

依赖的线粒体自噬过程,表明亚精胺可以激活 ATM-ser1981 位点的磷酸化影响细胞衰老^[4,5]。而细胞衰老的主要因素是细胞内外环境变化导致的 DNA 损伤累积^[6,7]。本研究通过检测年轻小鼠和年老小鼠体内亚精胺含量的变化,进一步检测不同小鼠组织中亚精胺合成通路的关键基因的表达量,考察亚精胺是否通过调控 DNA 损伤的应答影响细胞衰老,从而探究亚精胺对机体衰老的影响。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31501109)

作者简介:敖英(1987-),博士,主要研究方向:衰老与肿瘤发生发展的关系,E-mail:kelleysweet@163.com

吴珠萍(1992-),硕士,主要研究方向:衰老与肿瘤发生发展的关系,E-mail:wuzhuping123@vip.qq.com

[#] 为共同第一作者

[△] 通讯作者:刘佐君(1982-),博士后,主要研究方向:衰老与生物节律,E-mail:ijing1982@szu.edu.cn

(收稿日期:2017-09-30 接受日期:2017-10-27)

1.1 材料

RNA 提取、反转录及荧光定量 PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司,高糖 DMEM 细胞培养液、0.25 % 胰蛋白酶及胎牛血清 FBS 均购于美国 Gibco 公司,GAPDH 抗体、actin、ATM、ATM-Ser1981 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司,KAP1、KAP1-Ser824 抗体购于美国 Abcam 公司;苯甲酰氯和 1,6-己二胺购自美国 Sigma 公司。Agilent 1200 高效液相色谱实验中心具备。不同年龄段的 C57BL 小鼠 60 只,由本实验室繁殖喂养。所涉及的动物实验均通过深圳大学医学院实验动物伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 动物实验分组 不同年龄段的 C57BL 小鼠,清洁级,由本实验室饲养,饲养环境为室温 22-24 °C,并给予充足的水分和标准饲料,选取合适年龄的青年组小鼠,实验分 2 组,老年组(old):18 月龄老年 C57BL 小鼠(实验中同时设置 12,18,24 月龄,分子水平检测 18 月龄开始出现明显衰老表型,故以 18 月龄作为老年组),自由饮水进食,青年对照组(young):自由饮水进食的 6 月龄 C57BL 小鼠。

1.2.2 高效液相色谱分析心脏和肝脏组织中亚精胺含量 不同年龄段的老鼠经麻醉后,快速解剖取出心脏和肝脏组织,利用预冷的 PBS 缓冲液漂洗血渍,分别剪取重量约为 100 mg 的

组织块,置入 0.3 mmol/L 预冷的高氯酸溶液中,组织匀浆器匀浆,低温离心,8500 rpm 离心 10 min,即为制备好的检测样品。取上清液体加入 NaOH、苯甲酰氯和 1,6-己二胺(内标),充分混匀,采用 40 °C 水浴 30 min,每个样品中加氯仿 2 mL,漩涡振荡,离心后提取其中的氯仿层,待液体挥发完全后将底部沉淀溶于甲醇中,取 40 μ L 样品利用高效液相色谱分析仪检测不同老鼠组织样品中亚精胺的含量,色谱条件:柱温 25 °C,流速为 0.6 mL/min,其中流动相甲醇与水的体积比为 V:V=65:35,紫外检测波长为 229 nm。

1.2.3 RNA 提取及荧光定量 PCR 分别取年老小鼠和年幼小鼠的心、肝脏、脾脏、肺、肾脏和脑组织(各 5 只),各组织样品先经组织匀浆器破碎,利用 TRIzol 试剂盒按说明提取总 RNA。测定 RNA 浓度及纯度,利用反转录试剂盒逆转录成 cDNA;用 2 μ g 的 RNA 进行逆转录。再利用产物作为模板,荧光定量 PCR 检测亚精胺合成途径中的关键基因 Odc、Srm 和 Amd1 的表达;使用 qPCR 试剂盒,利用 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪分析样品中目的基因 mRNA 含量。PCR 反应体系为 20 μ L,成分为:cDNA 1 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,Mixture (2 $\times$) 10 μ L,H₂O 8 μ L。扩增程序条件为:95 °C 预变性 5 min;PCR 反应 95 °C 15 s,55 °C 15 s,72 °C 40 s,共 40 个循环。各组扩增结果以 beta-actin 为内参,利用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法做相对定量分析。

表 1 q RT-PCR 引物

Table 1 q RT-PCR primers

Name	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
Odc	GACGAGTTTGACTGCCACATC	CGCAACATAGAACGCATCCTT
Srm	ACATCCTCGTCTTCCGCAGTA	GGCAGGTTGGCGATCATCT
Amd1	AGGGATCTGGGGATCTTCGTA	TGCTTGTCAGTCTTTGTCACAC
β -actin	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

1.2.4 Western Blot 检测 DNA 损伤后蛋白表达水平 利用人的皮肤成纤维细胞 F2S(P27 代细胞,已表现出衰老现象),加入 4 μ mol 的喜树碱 CPT 处理细胞 1 小时诱导 DNA 损伤^[9]。利用 Thermo Scientific -PER 蛋白抽提试剂,新鲜加入蛋白酶抑制 cocktail,经超声后破碎细胞,12000 $\times$ g 离心 10 min,取上清,BCA 法定量,每泳道上样量 20 μ g,SDS-PAGE 电泳条件为浓缩电压 60 V,分离电压 120 V。电泳结束后,用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,湿转条件为恒流 300 mA,2 h。转膜结束后,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,然后加入相应的一抗 4 °C 过夜孵育。次日,TBST 洗 3 次,每次 10 min。室温孵育二抗 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min。采用 ECL 试剂盒进行化学发光检测,利用 BIO-RAD 公司的成像仪采集图片并分析。

1.2.5 统计学方法 将实验所得数据经 GraphPad Prism 软件处理,数据之间的差异采用 mean $\pm$ s.e.m,2-tailed student t test。*P<0.05 代表具有统计学差异,**P<0.01 代表差异具有显著性***P<0.001 代表差异极显著。

2 结果

2.1 年老老鼠和年轻老鼠不同组织亚精胺含量测定

与年轻老鼠(Young)组比较,年老老鼠(Old)组心脏组织和肝脏组织中亚精胺的含量明显下降,即心脏(199.09 $\pm$ 17.12)和肝脏组织(168.92 $\pm$ 5.12) 分别下降为 78.01 $\pm$ 13.52、62.05 $\pm$ 6.73,并且总多胺的水平也表现为明显下降,差异具有显著性(P<0.05),结果见表 2。

表 2 不同年龄小鼠心脏和肝脏组织中亚精胺含量测定

Table 2 Detection of spermidine in heart and liver tissue of different age mice

Amount(n)		Heart	Liver
Group	n	Spermidine/(nmol/g)	Spermidine/(nmol/g)
Young	9	199.09 $\pm$ 17.12	168.92 $\pm$ 5.12
Old	9	78.01 $\pm$ 13.52*	62.05 $\pm$ 6.73*

2.2 年老老鼠和年轻老鼠不同组织亚精胺合成通路关键基因表达量检测

亚精胺合成途径中的关键基因 Odc、Srm 和 Amd1 在年老的小鼠中各个组织都表现为下降趋势,年老组与年幼组相比具有极显著差异。其中 Odc、Srm 和 Amd1 相对表达量脾脏(分别

由 32.97、20.45 和 26.04 下降至 10.78、8.32 和 10.32)肝脏(由 9.43、14.36 和 10.10 下降为 2.77、4.34 和 7.77)和脑(由 19.90、14.77 和 22.14 下降为 6.67、5.38 和 6.30) 组织中下降最为显著,P 值均具有极显著差异,结果见图 1 所示。

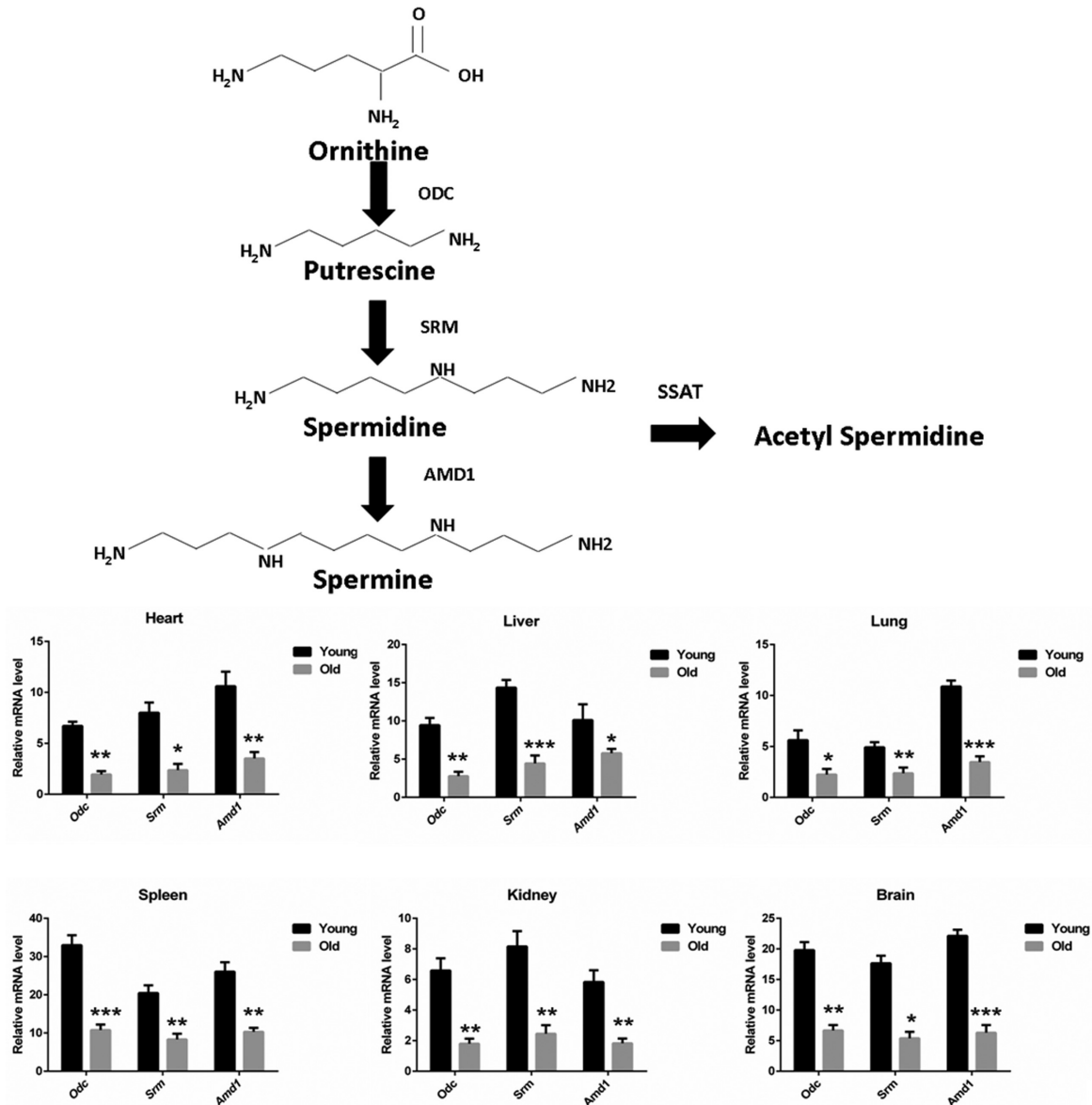


图 1 不同年龄段小鼠不同组织中亚精胺合成关键基因的转录水平检测

(A)多胺生物合成途径示意图;(B)RT-qPCR 检测年老老鼠和年轻老鼠不同组织中亚精胺合成途径的关键基因的表达量变化。

Fig.1 Transcription level of spermidine synthesis gene in different tissues of different age mice

(A) Schematic diagram of polyamine biosynthetic pathway; (B) Detection expression level of spermidine synthesis gene by RT-qPCR in different tissue.

2.3 衰老小鼠中亚精胺合成障碍影响细胞的 DNA 损伤应答

在有亚精胺处理的情况下,DNA 损伤的标志物 γ H2AX 的蛋白表达水平明显上调,相对于未处理上调 1.6 倍;进一步检测 DNA 损伤应答的经典通路 ATM-KAP1 通路,发现,在有亚精胺处理的情况下,ATM 自身 ser1981 位点磷酸化增加,并且其底物蛋白 KAP1-Ser824 位点的磷酸化水平显著升高,总蛋白变化趋势不明显。

3 讨论

衰老是生命过程中的一种生理现象,在细胞水平表现为增殖和自我修复能力的减退;在机体水平表现为脏器萎缩和机能衰退^[9]。通常情况下机体的老化是缓慢的、渐进的,一般不会出现明显的生理功能障碍,但特异的基因突变可引起机体老化加速和一些生理功能障碍,从而出现早衰^[10]。研究报道表明,影响细胞衰老的主要因素是细胞内外环境变化导致的 DNA 损伤累积^[11]。衰老的存在普遍表现特征,主要包括:端粒的缩短、基因组不稳定、表观遗传改变(组蛋白的修饰、DNA 的甲基化和染色质的重塑)、蛋白平衡的改变、营养感应失常、细胞衰老、线粒

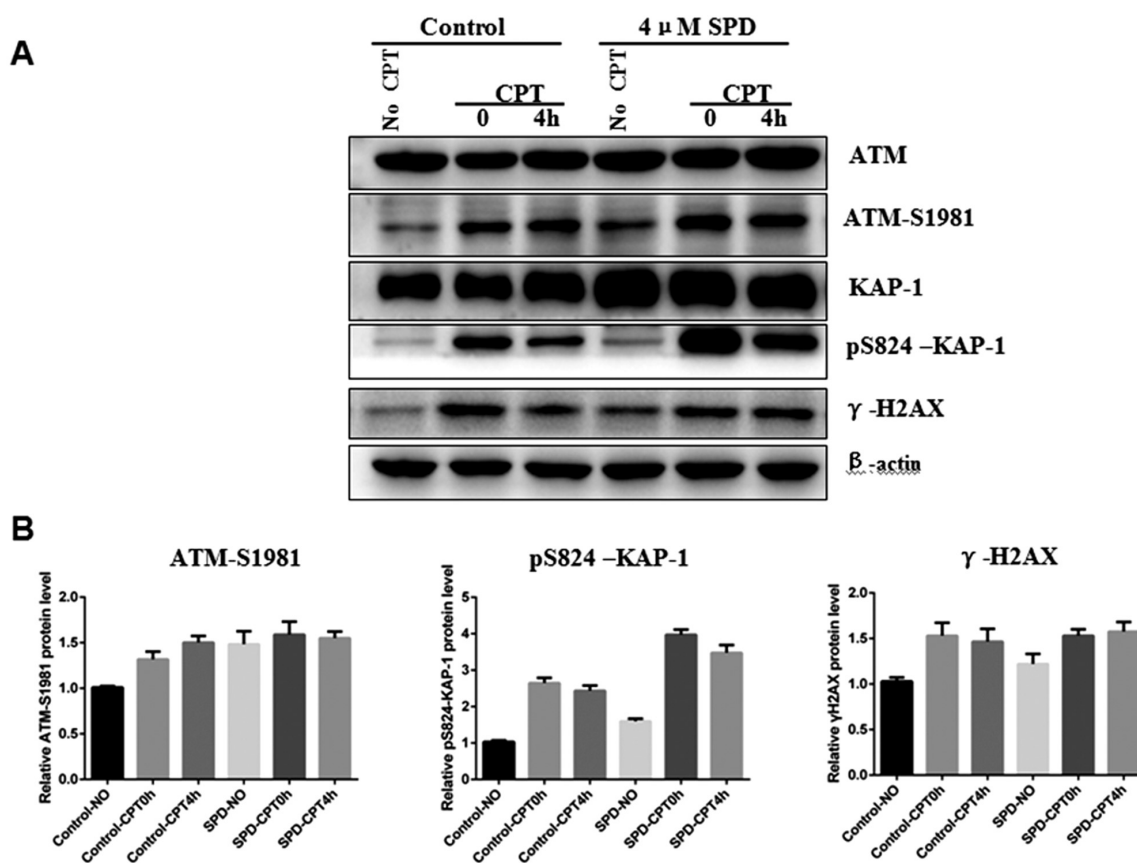


图2 亚精胺影响DNA损伤应答的ATM-KAP1通路

(A)蛋白印迹检测DNA损伤应答的ATM-KAP1通路相关蛋白;(B)利用ImageJ软件统计分析损伤应答marker蛋白的表达量

Fig.2 Spermidine affects the DNA damage response in ATM-KAP1 pathway

(A) Western blot analysis of DNA damage response in ATM-KAP1 pathway-associated protein;(B)Relative levels of ATM-S1981, pS824-KAP-1 and γ-H2AX after SPD treatment and controls using ImageJ software

体功能障碍、干细胞耗竭、细胞间通讯改变^[12]。其中与衰老的特点和影响因素关系最为密切的分子机制为DNA的损伤修复。细胞衰老过程伴随对各种内外环境应激能力的下降,例如氧化应激,DNA损伤修复和细胞内物质交替等,以及由此造成的各种大分子和细胞器损伤的累积^[13]。先天性DNA损伤修复缺陷会引起许多复杂的人类疾病,主要表现为三类DNA修复症状:发育异常、组织特异癌易感性和早老^[14]。因此,对衰老发生发展机制的研究以及开发延缓人类抗衰老的药物具有重大意义。

天然成分的亚精胺普遍存在于动植物细胞中,并且具有重要的生物学功能^[15]。研究表明,亚精胺可通过自噬参与衰老的调控^[12],可提高细胞自噬水平,其作用机理是亚精胺作为组蛋白乙酰化酶的抑制剂,能够上调自噬基因ATG的表达,从而激活自噬延长机体寿命。但亚精胺不能延长自噬缺陷的酵母菌、线虫类和果蝇的寿命^[16,17]。其次,亚精胺可减少体内自由基的积累^[18,19]。在许多生理性疾病中检测发现,亚精胺的异常可以诱发退行性神经病变^[20],亚精胺可以通过清除脂质过氧化物,使其从氧化型状态变成还原型状态来保护细胞膜的结构等^[21,22]。再次,亚精胺还可以影响与衰老有关的记忆能力,在果蝇的实验中表明使用亚精胺可以让年老的果蝇大脑性能恢复到年轻果蝇的水平^[23],而在模式生物的研究中,果蝇和老鼠的记忆过程在分子机制水平上是类似的。利用亚精胺对小鼠模型中的影响进行研究,有助于开发新的治疗和预防老年痴呆症的

药物。结合已有研究报道表明,亚精胺具有抗衰老、延缓动物脑及器官萎缩与退化、降低血压、提高抗疲劳能力等作用^[18,23-25]。但其具体的分子机制还不清楚,尤其是亚精胺在机体内的含量多少对机体衰老的影响,有助于指导临床上抗衰老药物的研究。

在本研究中,我们揭示了小鼠不同组织内源性亚精胺含量对小鼠衰老的影响。近期研究报道,通过给小鼠喂食亚精胺可延缓小鼠寿命^[26],但文中并未提及其分子机制。首先,我们考察了在C57BL小鼠模型中,年老小鼠和年幼小鼠体内内源性亚精胺的含量是否存在变化。结果表明,年老小鼠组和年幼小鼠组相比,心脏和肝脏组织中的内源性亚精胺含量明显降低,这表明随着衰老的发生,机体内亚精胺的含量明显降低,这进一步解释了为什么亚精胺可以延长果蝇及小鼠寿命的原因。那么导致这一降低的原因是什么呢?我们通过进一步检测不同组织(包括心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏以及脑组织)中精胺类生物合成代谢途径中的关键基因,结果显示,Odc,Srm,Amd1等关键基因的表达水平在年老的个体中的各组织器官中的表达都明显被抑制,该结果表明随着衰老程度的增加,在组织水平上亚精胺的合成通路存在障碍。说明机体组织器官中亚精胺的功能缺陷会加速机体衰老的进程。为了进一步探究其分子机制,检测细胞水平上亚精胺对衰老的主要通路即DNA损伤信号通路的影响,给药组的细胞对DNA损伤应答明显高于对照组,从western blot结果可明显观察到γH2AX、KAP-1-ser824以

及 ATM 自身的磷酸化 ATM-ser1981 位点的磷酸化水平在 CPT 处理以后明显增强,从而激活 ATM-KAP1 通路的磷酸化信号转导,有利于细胞 DNA 损伤修复过程。已有研究报道,ATM-KAP1 通路是调控衰老过程的主要通路^[27],而我们检测到衰老的小鼠体内亚精胺的含量明显减少,ATM-KAP-1 通路不能正常被激活,可能导致细胞内存在的 DNA 损伤不能及时被修复,从而进一步加速衰老的发生。因此我们的研究结果提示:亚精胺可以通过增强 DNA 损伤应答通路 ATM-KAP-1 的磷酸化水平,从而有利于细胞的 DNA 损伤修复过程。但亚精胺如何影响 ATM-KAP-1 通路的激活机制以及亚精胺延缓细胞衰老表型除了 DNA 损伤修复机制以外,是否还存在其他通路还需进一步探究。

综上所述,随着小鼠衰老的增长亚精胺在体内的水平明显降低,并且其合成的关键基因下调表达;内源性亚精胺的缺失,导致细胞对 DNA 损伤应答存在障碍,从而加速衰老。通过提高亚精胺的水平有利于机体细胞的 DNA 损伤应答过程,从而为临床上寻找新的抗衰老药物和作用靶点提供理论基础和新思路。

参考文献(References)

- [1] Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11 (11): 1305-1314
- [2] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol [J]. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1(12): 961-970
- [3] Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine [J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1428-1438
- [4] Qi Y, Qiu Q, Gu X, et al. ATM mediates spermidine-induced mitophagy via PINK1 and Parkin regulation in human fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24700
- [5] Sordet O, Nakamura A J, Redon C E, et al. DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(2): 274-278
- [6] Safdar A, Annis S, Kraytsberg Y, et al. Amelioration of premature aging in mtDNA mutator mouse by exercise: the interplay of oxidative stress, PGC-1alpha, p53, and DNA damage. A hypothesis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 38: 127-132
- [7] Soares J P, Cortinhas A, Bento T, et al. Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study [J]. *Aging (Albany NY)*, 2014, 6(6): 432-439
- [8] Liu J, Yin X, Liu B, et al. HP1alpha mediates defective heterochromatin repair and accelerates senescence in Zmpste24-deficient cells [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(8): 1237-1247
- [9] Erikson G A, Bodian D L, Rueda M, et al. Whole-Genome Sequencing of a Healthy Aging Cohort[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 1002-1011
- [10] Ahmed M S, Ikram S, Bibi N, et al. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2017
- [11] Collado M, Blasco M A, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging[J]. *Cell*, 2007, 130(2): 223-233
- [12] Lopez-Otin C, Blasco M A, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-1217
- [13] Criscione S W, Teo Y V, Neretti N. The Chromatin Landscape of Cellular Senescence[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(11): 751-761
- [14] Ermolaeva M A, Schumacher B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(3): 95-102
- [15] Ridler C. Cardiovascular endocrinology: Spermidine enhances cardiovascular health[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(2): 66
- [16] Pietrocola F, Lachkar S, Enot D P, et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300 [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 509-516
- [17] Madeo F, Eisenberg T, Buttner S, et al. Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir [J]. *Autophagy*, 2010, 6 (1): 160-162
- [18] Noro T, Namekata K, Kimura A, et al. Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1720
- [19] Yamamoto T, Hinoi E, Fujita H, et al. The natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disruption of osteoclastic activation in ovariectomized mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(3): 1084-1096
- [20] Gupta V K, Pech U, Bhukel A, et al. Spermidine Suppresses Age-Associated Memory Impairment by Preventing Adverse Increase of Presynaptic Active Zone Size and Release[J]. *PLoS Biol*, 2016, 14(9): e1002563
- [21] Ohashi K, Kageyama M, Shinomiya K, et al. Spermidine Oxidation-Mediated Degeneration of Retinal Pigment Epithelium in Rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4128061
- [22] Yoshida T, Sakamoto A, Terui Y, et al. Effect of Spermidine Analogues on Cell Growth of Escherichia coli Polyamine Requiring Mutant MA261[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159494
- [23] Davis R L. Spermidine cures flies of senior moments[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(10): 1363-1364
- [24] Noro T, Namekata K, Azuchi Y, et al. Spermidine Ameliorates Neurodegeneration in a Mouse Model of Normal Tension Glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(8): 5012-5019
- [25] Buttner S, Broeskamp F, Sommer C, et al. Spermidine protects against alpha-synuclein neurotoxicity [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13 (24): 3903-3908
- [26] De Cabo R, Navas P. Spermidine to the rescue for an aging heart[J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1389-1390
- [27] Liu B, Wang Z, Ghosh S, et al. Defective ATM-Kap-1-mediated chromatin remodeling impairs DNA repair and accelerates senescence in progeria mouse model[J]. *Aging Cell*, 2013, 12(2): 316-318