· 基础研究 ·

丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2的表达与大鼠肝功能衰老的关系

焦 昆，孙 琪，马 璐，刘 鑫，李 浩，王环愿，王 雯，刘慧荣*

（首都医科大学基础医学院生理与病理生理学系，北京 100069）

【摘 要】**目的** 观察促凋亡蛋白丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2在衰老大鼠心、肾、肝、肺和脾中的表达情况，研究大鼠肝中Omi/HtrA2的表达与肝功能衰老程度的相关性。**方法** 选用3月龄、9月龄和22月龄雄性SD大鼠；多普勒超声方法检测动物心功能；血清生化方法检测动物的肝功能；免疫组化方法比较Omi/HtrA2在心、肝、肺、肾、脾中的表达情况；Western免疫印迹方法检测动物肝中Omi/HtrA2表达情况。**结果** （1）在心、肾、肝和肺中，Omi/HtrA2表达量都很高，且蛋白的表达位置有一定的细胞特异性；与壮年组相比，衰老组大鼠的肝中Omi/HtrA2的表达量显著下降（$P < 0.05$），而在心、肾、肺组织中Omi/HtrA2的表达量也有下降的趋势，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）；（2）与壮年组相比，衰老组动物肝功能指标：天冬氨酸氨基转移酶（AST）、血清铁（SI）、白蛋白（ALB）、白蛋白与球蛋白比值（A/G）都发生显著改变（$P < 0.05$）；衰老组动物的心功能指标：左室短轴缩短率（FS）和左室射血分数（LVEF）都有下降趋势，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）；（3）与壮年组相比，中年组和衰老组大鼠的肝中Omi/HtrA2的表达量显著下降（$P < 0.05$），随着年龄增加肝功能逐渐降低，Omi/HtrA2的表达量与ALB和A/G呈显著正相关（$P < 0.05$）。**结论** 大鼠肝中Omi/HtrA2的表达量与肝功能呈正相关。

【关键词】大鼠；衰老；Omi/HtrA2；心功能；肝功能

【中图分类号】 R339.3+8 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.02.032

Relationship of serine protease Omi/HtrA2 expression with aging of liver function in rats

JIAO Kun, SUN Qi, MA Lu, LIU Xin, LI Hao, WANG Huan-Yuan, WANG Wen, LIU Hui-Rong*

(Faculty of Physiology and Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expression of proapoptotic serine protease, Omi/HtrA2, in the heart, kidneys, liver, lungs and spleen of rats at different ages and to explore the correlation between its expression and the aging of liver function. **Methods** Male SD rats at the age of 3, 9 or 22 months were employed in the study. Their heart function was evaluated by echocardiography, and liver function was tested by automatic biochemical analysis. The expression level and location of Omi/HtrA2 in the above mentioned organs were determined by immunohistochemical staining. The expression of Omi/HtrA2 in the liver was detected by Western blotting. **Results** (1) Omi/HtrA2 Was highly expressed in the heart, kidneys, liver and lungs of rats from different age groups, and mainly in certain types of cells in different organs. Compared with the young group, its expression was markedly decreased in the liver of rats from aged groups ($P < 0.05$). But no significant difference was seen in the other organs between the young and aged groups though with a trend of descending ($P > 0.05$). (2) There were significant differences in the liver function indices, such as the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), serum iron (SI), albumin (ALB), and ratio of albumin to globulin (A/G) between the young and aged rats ($P < 0.05$). The cardiac function indicators, fractional shortening (FS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were in a trend of decreasing in the aged rats compared with the younger though without obvious difference ($P > 0.05$). (3) The expression level of Omi/HtrA2 was obviously reduced in the middle aged and aged rats than the young ones ($P < 0.05$). The liver function was also descended with aging. There was a positive correlation of the expression level of Omi/HtrA2 with the level of ALB and ratio of A/G ($P < 0.05$). **Conclusion** The liver expression of Omi/HtrA2t is positively correlated with liver function in rats.

【**Key words**】 rats; aging; Omi/HtrA2; heart function; liver function

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81270283).

Corresponding author: LIU Hui-Rong, E-mail: liuhr2000@126.com

---

收稿日期： 2014−11−04；**修回日期：** 2015−01−05

基金项目： 国家自然科学基金（81270283）

通信作者： 刘慧荣, E-mail: liuhr2000@126.com

衰老（aging）被认为是从细胞到组织水平损伤不断积累，机体系统稳定性降低，最终导致组织、器官的生理功能下降的过程[1]。与衰老有密切联系的心脑血管疾病、自身免疫系统疾病、肿瘤等疾病严重威胁着人类的健康。因此，了解衰老的发生发展机制，对于人类预防疾病、提高生存质量都具有重要意义。虽然对于衰老的研究已经有很多，但其发生机制迄今还不十分清楚。

丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2隶属于HtrA（High temperature requirement A，HtrA）家族，主要存在于细胞的线粒体中。在细胞中可以通过半胱氨酸蛋白酶（胱天蛋白酶，cysteine-dependent aspartate-specific proteases，caspases）家族依赖和非依赖途径参与细胞凋亡的发生发展[2]。但最新的研究发现，当小鼠体内Omi/HtrA2蛋白酶活性丧失后，动物机体会表现出一些衰老的特征[3]。这个实验提示Omi/HtrA2可能与衰老有关。因此，本实验的目的是探究生理状态下Omi/HtrA2的表达与器官衰老的可能联系，为衰老机制的相关研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 动物

壮年组（young）使用3月龄（$n = 6$），中年组（middle-aged）使用9月龄SPF级SD雄性大鼠（$n = 5$）[北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2012-0001]。衰老组（aged）使用22月龄SPF级雄性SD大鼠（$n = 6$）[长沙市天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK（湘）2009-0012]。在大鼠肝中Omi/HtrA2表达与肝功能相关性研究部分，每组大鼠均各取5只。动物实验通过首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会相关审查，伦理编号：AEEI-2014-076。

1.2 主要试剂

Omi/HtrA2兔来源一抗（美国Abcam公司，货号ab32092）。兔超敏二步法检测试剂盒（北京中杉金桥，货号PV-9001）。β-actin小鼠来源一抗（美国Santa公司，货号sc-47778），辣根酶标记山羊抗兔IgG（货号ZB-2301），辣根酶标记山羊抗小鼠IgG（均北京中杉金桥，货号ZB-2305）。

1.3 仪器

全自动生化分析仪（Hitachi，7180），高分辨率小动物超声影像系统（VisualSonics，Vevo-770）。

1.4 实验方法

1.4.1 心功能检测 按200mg/kg剂量腹腔注射5%水合氯醛诱导麻醉大鼠。动物胸部备皮，仰卧位固定于动物固定台上，连接呼吸麻醉面罩。使用RMV-716型大鼠高频探头（频率：17.5MHz）。使用高分辨率小动物超声影像系统自带的软件测量指标：左室短轴缩短率 （fractional shortening，FS）和左室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）。

1.4.2 动物安乐死及取材 按照350mg/kg剂量腹腔注射5%水合氯醛麻醉大鼠后，打开腹腔，从腹主动脉采集适量血液，用于生化检测。使用断头方法活杀动物。迅速剪取动物的心、肝、脾、肺、肾的部分组织，分别放入4%多聚甲醛和液氮中固定。

1.4.3 免疫组织化学染色 组织在4%多聚甲醛中充分固定，常规方法制作蜡块、切片，Omi/HtrA2一抗按1∶150稀释，免疫组化染色步骤按照二抗试剂盒的说明书进行。结果使用IPP6.0图像分析软件进行半定量分析。在相同放大倍数下，每张切片选取5个区域，取积分光密度（integrated optic density，IOD）的平均值代表该切片的蛋白表达水平。

1.4.4 肝功能检测 使用真空采血管从动物腹主动脉采集全血，3000r/min，4℃离心10min，取上清。采用生化分析仪检测肝功能指标。

1.4.5 Western免疫印迹 常规方法提取肝组织蛋白，BCA方法测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳条件：使用5%浓缩胶和12%分离胶，80V跑20min后改为120V直到溴酚蓝跑出终止电泳。转膜条件：0.22μm硝酸纤维膜，湿转200mA，40min。Omi/HtrA2一抗浓度1∶1000，二抗浓度1∶2000；β-actin一抗浓度1∶2000，二抗浓度1∶2000。化学发光方法检测蛋白量。结果使用Image Lab5.0软件处理。

1.5 统计学处理

数据统计采用SPSS17.0分析软件，两两比较采用独立样本*t*检验，相关性分析采用Pearson相关。所有数据以$\bar{x} \pm s$表示，相关系数用*r*表示，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Omi/HtrA2在衰老组大鼠与壮年组大鼠心、肾、肝、肺和脾中的表达

2.1.1 不同组织器官中Omi/HtrA2的表达情况 Omi/HtrA2在心广泛表达于心肌细胞中；在肾主要表达在肾小管上皮细胞中；在肝广泛表达于肝实

质细胞中；在肺主要表达在平滑肌细胞中；在脾表达位置分散且表达量非常低（图1A）。

2.1.2 衰老大鼠肝中Omi/HtrA2的表达量下降 通过对免疫组化染色结果的半定量分析可见，与壮年组大鼠相比，衰老组大鼠肝中Omi/HtrA2的表达量显著下降（$P < 0.05$）；在心、肺、肾、脾中蛋白表达量差异无统计学意义（$P > 0.05$；图1B）。

2.2 衰老大鼠与壮年大鼠肝和心功能比较

2.2.1 衰老大鼠与壮年大鼠肝功能比较 反映肝功能的血清生化检测结果显示，与壮年大鼠相比，衰老大鼠的天冬氨酸氨基转移酶（aspartate transaminase，AST）、血清铁（serum iron，SI）、血清白蛋白（serum albumin，ALB）和白蛋白与球蛋白比值（albumin/glbumin，A/G）这4项指标的结果都出现了异常，且这些差异均具有统计学意义（$P < 0.05$；图2）。衰老大鼠肝功能较壮年大鼠有显著下降。

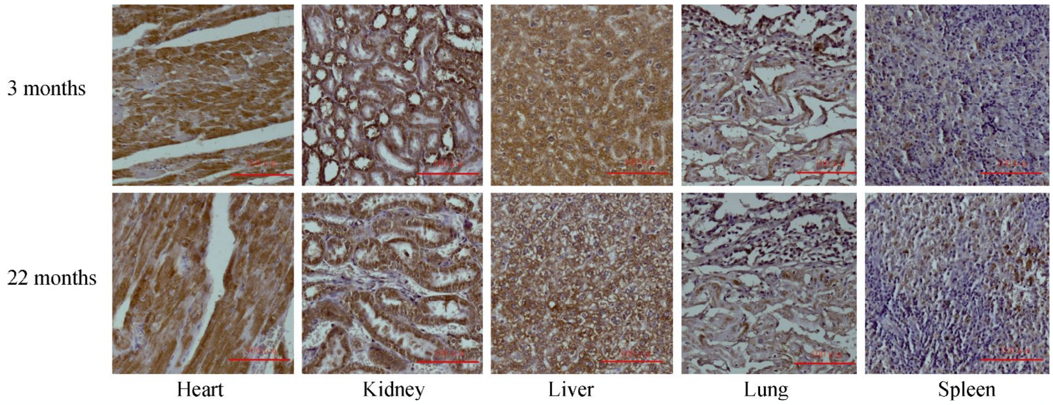
2.2.2 衰老大鼠与壮年大鼠心功能比较 在左室短轴的二维图像引导下，取M型曲线，测量心功能指标LVEF和FS。结果显示，与壮年组相比，衰老大鼠的两项心功能指标虽均有下降的趋势，但差异无统计学意义（$P > 0.05$；图3）。衰老大鼠心功能较壮年大鼠无明显下降。

2.3 大鼠肝中Omi/HtrA2表达与肝功能相关性

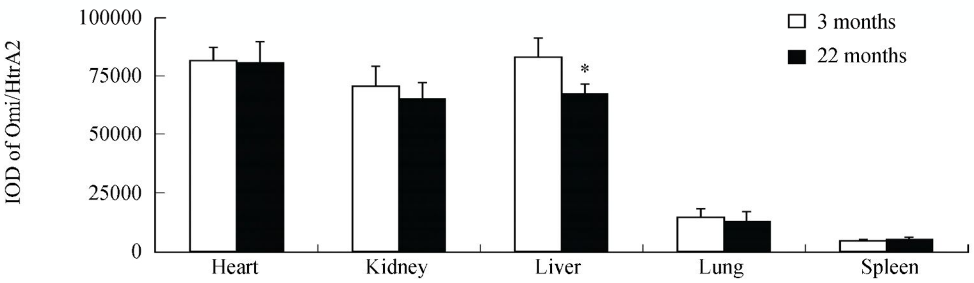
研究显示，衰老大鼠肝功能出现异常，且肝中Omi/HtrA2表达降低；进一步研究发现，与壮年组相比，中年组和衰老组大鼠肝中Omi/HtrA2表达下降，差异具有统计学意义（$P < 0.05$；图4A）。生化检测结果显示，随着年龄的增加大鼠肝功能指标ALB和A/G均下降，且差异具有统计学意义（$P < 0.05$；图4B）。Pearson 相关性分析结果显示，Omi/HtrA2的表达量与ALB呈正相关，且具有统计学意义（$r = 0.589$，$P < 0.05$；图4C）；Omi/HtrA2的表达量与A/G呈正相关，且具有统计学意义（$r = 0.772$，$P < 0.01$；图4D）。以上结果提示大鼠Omi/HtrA2的表达与肝功能之间呈正相关。

3 讨 论

研究发现，正常情况下，Omi/HtrA2存在于细胞的线粒体中，当细胞受到外界刺激时，则被释放到胞浆中参与细胞凋亡发生[4,5]。那么Omi/HtrA2当存在于线粒体中时，是否具有生物学效应？研究发现，当小鼠的非神经系统的组织、器官中Omi/HtrA2失去蛋白酶活性时，小鼠出现被毛脱落、生殖能



A



B

图1 Omi/HtrA2在壮年和衰老大鼠心、肾、肝、肺和脾中的表达

Figure 1 Omi/HtrA2 expression in heart, kidneys, liver, lungs and spleen of rats from 3 months and 22 months groups ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

A: Immunohistochemical staining for Omi/HtrA2. Omi/HtrA2 (tan color) is expressed in all those organs of rats from two groups (Scale bar, 100μm). B: quantitative analysis for the expression level of Omi/HtrA2. Compared with 3 months group, $^*P < 0.05$

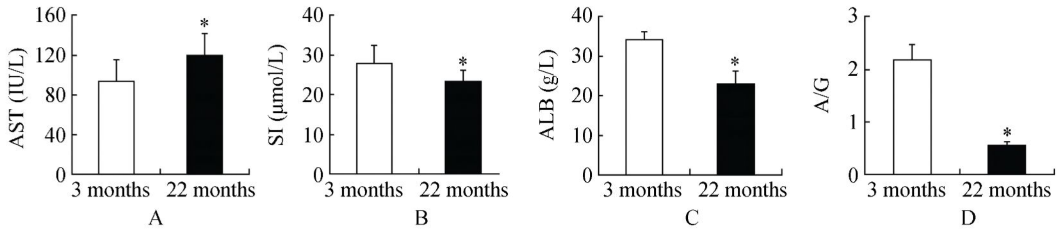


图2　壮年大鼠和衰老大鼠的肝功能

Figure 2　The liver function of rats from 3 months and 22 months groups ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

AST: aspartate transaminase; SI: serum iron; ALB: serum albumin; A/G: albumin/globumin; A: AST; B: SI; C: ALB; D: A/G. Compared with 3months group, $^{*}P < 0.05$

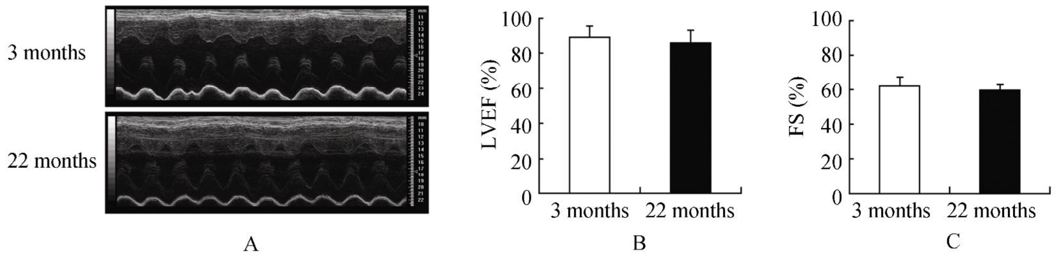


图3　多普勒超声方法检测大鼠心功能

Figure 3　Detection of cardiac function of rats from 3 months and 22 months groups by Doppler ultrasonograpty ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

LVEF: left ventricular ejection fraction; FS: fractional shortening of left ventricule; A: M-mode curve of Doppler ultrasonograpty. B: LVEF of rats in different groups. C: FS of rats in different groups

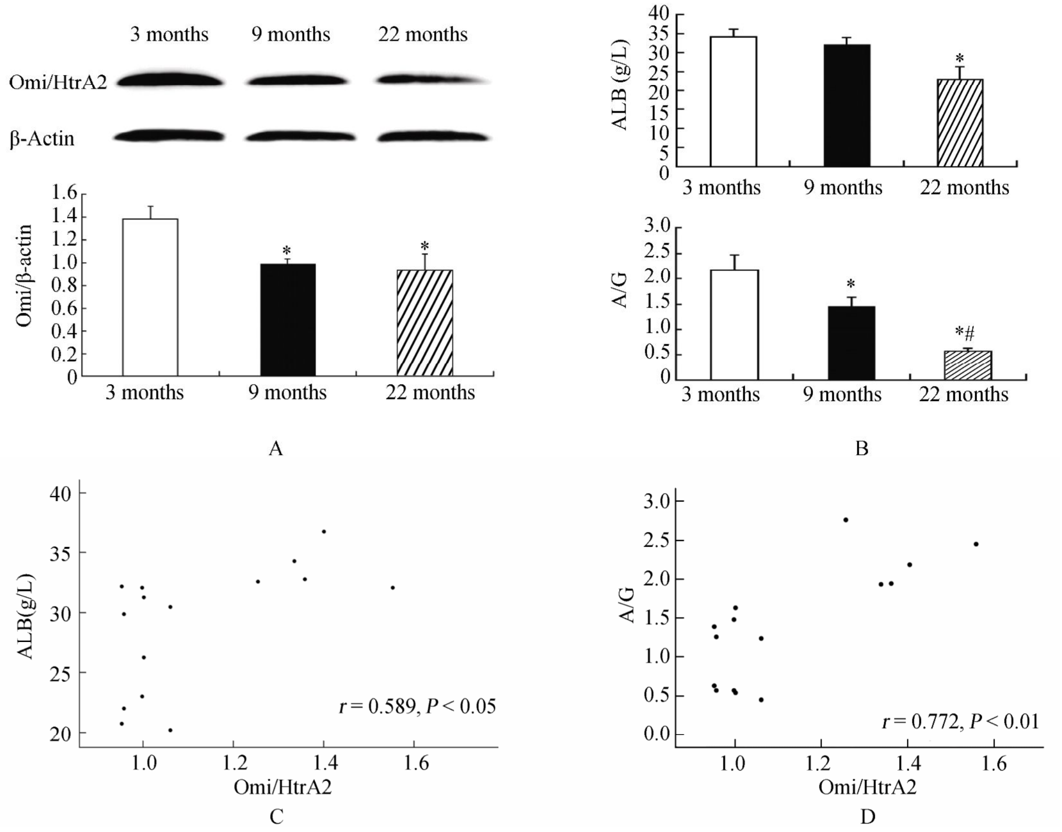


图4　Omi/HtrA2与肝功能的相关性

Figure 4　The correlation of Omi/HtrA2 with liver function ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

ALB: serum albumin; A/G: albumin/glbumin. A: Western blot of liver homogenates from different groups with antibodies specific for Omi/HtrA2. Compared with 3 months group, $^{*}P < 0.05$. B: biochemical analysis for ALB and A/G from different groups. Compared with 3 months group, $^{*}P < 0.05$; compared with 9 months group, $^{\#}P < 0.05$. C: Pearson correlation analysis for Omi/HtrA2 and ALB. D: Pearson correlation analysis for Omi/HtrA2 and A/G

力下降、体质量降低、脊柱弯曲等多种类似衰老的现象。而线粒体在衰老过程中具有重要意义[6]。这些实验都提示，在正常情况下，存在于线粒体的Omi/HtrA2同样具有作用，这种作用可能与衰老之间存在一定的联系。

本实验结果提示，在不同器官中都有Omi/HtrA2

的表达；特别是在衰老大鼠的肝中我们发现随着月龄的增加Omi/HtrA2的表达显著减低。为什么其他器官Omi/HtrA2的表达变化不显著呢？我们认为这种现象可能与22月龄大鼠的不同器官衰老程度有关。有意思的是，通过对心的超声检测发现，22月龄大鼠的心并未出现明显衰老的现象，这与文献[7]的研究结果一致。肝功能检测结果提示随着年龄的增加大鼠肝功能出现衰老，与文献[8]的研究结果一致。运用Pearson相关性分析方法评价大鼠肝中Omi/HtrA2的表达与其功能的相关性，结果提示Omi/HtrA2表达下降与肝功能指标降低程度呈正相关。另外实验结果显示，Omi/HtrA2表达下降的发生早于肝功能下降。因此实验结果提示，Omi/HtrA2可能参与了肝衰老的发生发展过程。

那么，Omi/HtrA2可能通过哪些途径参与到肝的衰老呢？目前已知可以引起衰老的因素包括遗传因素、氧自由基损伤、线粒体DNA（mtDNA）突变、应激能力下降等[1,9,10]。肝作为重要的能量代谢器官，其细胞中含有丰富的线粒体。研究发现，Omi/HtrA2参与线粒体功能的维持，缺失Omi/HtrA2可以导致mtDNA突变增加[3,11,12]。这提示，Omi/HtrA2可能通过促进线粒体的稳定，从而抑制肝的衰老。另外近几年的研究发现自噬通过维持细胞内稳态，对于延缓衰老也起到重要的作用[13−16]，Li等[17]的研究发现，Omi/HtrA2可以通过抑制Hax-1的作用，从而促进beclin-1的促自噬作用。Cilenti等[18]报道了Omi/HtrA2与线粒体泛素化连接酶激活剂NF-κB（mulan）和线粒体自噬关系。这些研究都提示，Omi/HtrA2可能通过影响自噬抑制衰老。但想要弄清Omi/HtrA2参与肝衰老的具体方式和机制，还需要今后进一步研究。

总之，本实验提示在生理状态下，Omi/HtrA2表达下降可能与老年大鼠肝功能下降有关。这为今后肝衰老机制的研究提供了新的思路。

【参考文献】

[1] Hou L, Huang J, Green CD, *et al*. Systems biology in aging: linking the old and the young[J]. Curr Genomics, 2012, 13(7): 558−565.

[2] Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(3): 453−460.

[3] Kang S, Louboutin JP, Datta P, *et al*. Loss of HtrA2/Omi activity in non-neuronal tissues of adult mice causes premature aging[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(2): 259−269.

[4] Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, *et al*. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death[J]. Mol Cell, 2001, 8(3): 613−621.

[5] Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, *et al*. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction[J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 432−438.

[6] Lauri A, Pompilio G, Capogrossi MC. The mitochondrial genome in aging and senescence[J]. Ageing Res Rev, 2014, 18C: 1−15.

[7] Slama M, Ahn J, Varagic J, *et al*. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(1): H181−H185.

[8] Sheedfar F, Biase SD, Koonen D, *et al*. Liver diseases and aging: friends or foes[J]? Aging Cell, 2013, 12(6): 950−954.

[9] Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging[J]. Antioxid Redox Sign, 2013, 19(12): 1362−1372.

[10] Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging[J]. J Cell Biol, 2011, 193(5): 809−818.

[11] Goo HG, Rhim H, Kang S. HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2014, 328(2): 456−465.

[12] Dagda RK, Chu CT. Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson’s disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis[J]. J Bioenerg Biomembr, 2009, 41(6): 473−479.

[13] Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition[J]. Autophagy, 2013, 9(5): 808−812.

[14] Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working[J]. Trends Genetics, 2008, 24(12): 604−612.

[15] Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function[J]. Nat Med, 2008, 14(9): 959−965.

[16] Goo H G, Jung MK, Han SS, *et al*. HtrA2/Omi deficiency causes damage and mutation of mitochondrial DNA[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(8): 1866−1875.

[17] Li B, Hu Q, Wang H, *et al*. Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative diseases[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(11): 1773−1784.

[18] Cilenti L, Ambivero CT, Ward N, *et al*. Inactivation of Omi/HtrA2 protease leads to the deregulation of mitochondrial Mulan E3 ubiquitin ligase and increased mitophagy[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(7): 1295−1307.

（编辑：周宇红）