

マウスの胎仔期と成熟期における 肝組織核の外的・内的酸化ストレス

田 和 理 市, 中 山 明 弘, 桜 井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室)

Exogenous and Endogenous Oxidation Stress in Liver Nuclei of Fetal and Adult Mice

Riichi TAWA, Akihiro NAKAYAMA and Hiromu SAKURAI
*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry,
Kyoto Pharmaceutical University*

In order to study the susceptibility of the oxidative damages by the free radicals of the mouse liver nucleus of birth near prenatal (16-days) and adult (21 ± 1.6 -weeks), the formation of 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) was compared. In vitro antioxidant capacity of both liver nuclei was also compared by using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method and the reducing ability of the Fe(III) ion (FRAP) method. It was shown that 8-OHdG formation in the liver nuclei of fetal mice was remarkably higher than in those of the adult, and that the fetal liver nuclei are very weak for exogenous oxidative stress. On the other hand, the antioxidant capacity of the fetal liver nuclei is more significant than that of the adult liver nuclei. Therefore, these results suggested that the mouse liver in fetal stage (16day-old) which is popular for the cell proliferation, was weak for exogenous oxidative stress, but it has some antioxidant mechanism defending for oxidative stress by the endogenous compounds, such as nucleus intrinsic metals.

低酸素環境下にある子宮内で育ってきた胎仔は、出生時に子宮収縮による物理的圧迫や虚血再環流あるいは高酸素ストレスなどに曝される。また、胎仔期の肝臓は、主として造血組織として働いている。マウス肝組織に対する外因性酸化ストレスに対する防御機構について考察するために、銅または鉄イオンと過酸化水素 (H_2O_2) から産生されるフリーラジカルによる肝クロマチンの損傷の違いについて検討

* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

した結果、マウス胎仔期の肝クロマチンは成熟期よりも感受性が強く、フリーラジカルに対する感受性が大きいことが示された¹⁾。本研究では、マウスの出生直前の胎仔期(16日齢)と成熟期における肝組織の外因性の、酸化ストレスによる肝クロマチン損傷の指標としての8-ヒドロキシデオキシグアニン(8-OHdG)の生成量の違いと、肝組織の核内の酸化的雰囲気(抗酸化能)の違いについて比較検討した。

実験材料

核はDDY系マウス(清水実験材料)の胎仔期(16日齢)と成熟期(21±1.6週齢,雌)の肝組織から単離した¹⁾。Cu(II)/H₂O₂反応系およびFe(III)/H₂O₂反応系のFenton反応により生成する肝細胞DNA中の8-OHdGは、8-OHdGモノクローナル抗体(日本油脂)を用いる免疫測定法により定量した。また、肝組織核の抗酸化能の評価には、(1)GlazerによるAAPH(2,2'-azobis[2-amidinopropane])を用いた酸素ラジカル吸収能測定法(ORAC法)²⁾と(2)CaoとPriorによるCu(II)-H₂O₂を用いたORAC法³⁾、およびBenzieとStrainによるFe(III)イオンの還元能測定法(FRAP法)⁴⁾を用いた。以下に用いた試薬と測定法を示す。

- (1) ORAC (AAPH) assay : 0.8 mM AAPH (Wako), Phycoerythrin (187 μg/L, Sigma), 66 mM phosphate buffer (pH 7.0), 37°C; RF-530 fluorescence spectrophotometer (Shimadzu)
- (2) ORAC (Cu²⁺ - H₂O₂) assay : 1.8 μgM CuSO₄, 0.06% H₂O₂, Phycoerythrin (187 μg/L), 66 mM phosphate buffer (pH 7.0), 37°C ; RF-530 fluorescence spectrophotometer (Ex 540 nm; Em 570nm)
- (3) FRAP assay : 1.6 mM FeCl₃, 0.8 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine) (Wako), 283 mM acetate buffer (pH 3.5), 37°C; Multi-spec 1500 spectrophotometer (Shimadzu)

核懸濁液中に含まれるヒストンおよび非ヒストンタンパク質の濃度は、Bradford法⁵⁾により行った。また、肝組織核中の銅と鉄の定量は、単離した核を湿式灰化し、フレームレス(炭素炉)原子吸光法(AA6500G-GFA6000; Shimadzu)により測定した。

結果と考察

マウスの出生直前の胎仔期の肝細胞核は、Cu(II)/H₂O₂反応系からのヒドロキシルラジカル(・OH)による8-OHdGの生成量が顕著に高くなり、成熟期のものよりも核の損傷が大きく、外因性の酸化ストレスに対して大変弱い状態にあることが示された(Table 1)。一方、肝細胞核の酸化ストレスに対する抵抗性について有機ラジカルの消去能(ORAC-AAPH法)および(・OH)消去能(ORAC-Cu²⁺/H₂O₂法)から評価すると、ヒストン・非ヒストンタンパク質を含む核懸濁液およびタンパク質除去した核懸濁液のリン酸抽出液のいずれも胎仔期の方が成熟期よりも大きかった(Fig. 1)。また、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質を含む核液のFe(III)イオンの還元能についても、胎仔期の方が成熟期よりも強かった。これらの結果は、細胞増殖期にあたる出生直前の胎仔期(16日齢前後)の肝組織は、外的な酸化ストレスに対しては損傷を受けやすいが、内在性の物質(とくに核内金属など)から生じる酸化ストレスに対しては、核内を大きな抗酸化的状態に保つことによって、DNA損傷を最小限に抑えていることが推察さ

Table 1. 8-OHdG concentrations in mouse liver nuclei produced by Cu (II)-H₂O₂ and Fe(III)-H₂O₂ reaction systems

| Oxidation Reaction System | Fetus (ng/ μ g DNA) | Adult (ng/ μ g DNA) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| No treatment | 2.4 \pm 0.8 | 1.1 \pm 0.5 |
| Cu (II) 25 μ M | 0 | 0 |
| Cu (II) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM | 282.5 \pm 20.7 | 15.8 \pm 5.1 |
| Cu (II) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM + Asc 100 μ M | 59.0 \pm 5.2 | 9.1 \pm 0 |
| Cu (II) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM + Asc 100 μ M + DMSO 1.4M | 166.1 \pm 23.8 | 18.7 \pm 5.1 |
| Fe (III) 25 μ M | 0 | 0 |
| Fe (III) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM | 3.2 \pm 1.2 | 1.4 \pm 0.2 |
| Fe (III) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM + Asc 100 μ M | 2.0 \pm 0.8 | 1.3 \pm 0.5 |
| Fe (III) 25 μ M + H ₂ O ₂ 2.8mM + Asc 100 μ M + DMSO 1.4M | 4.3 \pm 0.9 | 0 |

All values represents the mean \pm SD from three determinations.

Reaction was carried out at 37°C for 1h in 1 mM phosphate buffer, pH7.4.

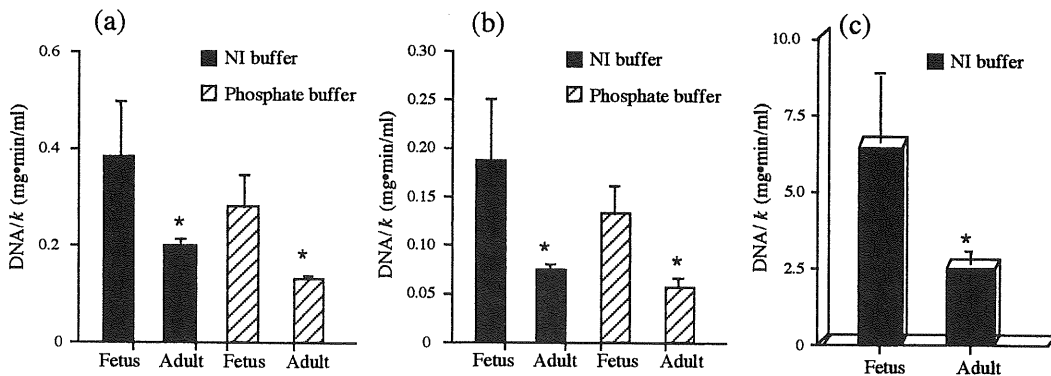


Fig. 1 Evaluation of antioxidative capacity of liver nuclear homogenates of fetal and adult mice and the phosphate buffer extracts by (a) ORAC-AAPH, (b) ORAC-Cu₂₊/H₂O₂ and (c) FRAP assay.

NI buffer: nuclear homogenates in nuclear isolation buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM CaCl₂ and 0.3 M sucrose, pH 7.4); Phosphate buffer: 75 mM phosphate buffer (pH 7.0) extracts of nuclear homogenates. * P < 0.05. Measurements were performed under the conditions described in the text.

れた。肝組織核内に存在する銅と鉄の濃度は、成熟期よりも組織の増殖がさかんな出生直前の胎仔期でいずれも高値を示した (Table 2)。今後、これら以外の核内在性の金属種とその濃度についても比較し、核の抗酸化能となんらかの関連性があるかどうかについて検討する必要がある。また、本研究で得られた核内の抗酸化能に關与する低分子および高分子の還元性物質の種類と濃度についても、さらに詳しく比較する必要があるものと思われる。

Table 2. Copper and iron concentrations in liver nuclei of fetal and adult mice

| Metals | Fetus (ng/ μ g DNA) | Adult (ng/ μ g DNA) |
|--------|-------------------------|-------------------------|
| Copper | 0.244 \pm 0.009 | 0.104 \pm 0.007 |
| Iron | 0.720 \pm 0.091 | 0.470 \pm 0.079 |

文 献

- 1) 田和理市, 桜井 弘 (1998) : 肝組織に対する酸化的ストレスの影響 : 銅または鉄イオンと過酸化水素からのフリーラジカルによる肝クロマチンの損傷. 微量栄養素研究 15 : 41
- 2) Glazer, A. N. (1990) : Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. *Methods Enzymol.* 186 : 161
- 3) Cao, G. and Prior, R. L. (1999) : Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. *Methods Enzymol.* 299 : 50
- 4) Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) : The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power" : The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239 : 70
- 5) Bradford, M (1976) : A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248 (1976)