

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.03.044

溶酶体组织蛋白酶参与宰后牛肉 AIF 介导细胞凋亡研究

张佳莹¹ 余群力¹ 韩玲¹ 李航² 殷元虎³ 韩明山⁴

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 重庆恒都农业开发有限公司, 丰都 408200;

3. 黑龙江畜牧兽医研究所, 齐齐哈尔 161000; 4. 内蒙古科尔沁牛业股份有限公司, 通辽 028000)

摘要: 为研究牛肉宰后成熟过程中凋亡诱导因子(AIF)介导细胞凋亡及溶酶体组织蛋白酶参与 AIF 活化机制, 选取 6 头西门塔尔杂交牛进行屠宰, 取其背最长肌于 4℃ 条件下成熟, 在不同成熟时间点(0、6、12、24、72、120、168 h)进行活性氧(ROS)相对含量、溶酶体膜稳定性、组织蛋白酶活性、线粒体膜通透性、AIF 表达及细胞核形态的测定。结果表明, 宰后成熟过程中, 牛肉 ROS 相对含量呈先降低后升高的趋势($P < 0.05$); 溶酶体膜稳定性逐渐降低($P < 0.05$); 组织蛋白酶 B、D 和 L 的活性逐渐升高($P < 0.05$); 线粒体膜通透性增大($P < 0.05$); AIF 在线粒体中的表达量于宰后 12 h 显著升高, 在之后的成熟时间降低($P < 0.05$), AIF 在细胞核中的表达呈上升的趋势($P < 0.05$), 与线粒体中的下降趋势相一致; 细胞核体积逐渐增大、部分核溶解, 并伴随细胞间隙变大的现象。表明牛肉在宰后成熟过程中生成 ROS, ROS 的累积导致溶酶体膜稳定性失衡, 使组织蛋白酶被释放, 作用于线粒体, 之后线粒体膜通透性发生变化, 释放 AIF, 活化的 AIF 进入细胞核内诱导凋亡发生。

关键词: 牛肉; 宰后成熟; 溶酶体组织蛋白酶; 凋亡诱导因子; 细胞凋亡

中图分类号: TS251.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)03-0354-07

Lysosomal Cathepsins in Apoptosis-inducing-factor-mediate Apoptosis of Bovine Muscle during Postmortem Aging

ZHANG Jiaying¹ YU Qunli¹ HAN Ling¹ LI Hang² YIN Yuanhu³ HAN Mingshan⁴

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. Chongqing Hengdu Agricultural Development Co., Ltd., Fengdu 408200, China

3. Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar 161000, China

4. Inner Mongolia Kerchin Cattle Industry Co., Ltd., Tongliao 028000, China)

Abstract: With the aim to investigate apoptosis-inducing-factor (AIF)-mediate apoptosis and mechanism of lysosomal cathepsins involved in AIF activation of bovine muscle during postmortem aging, six healthy Simmental crossbreeding local yellow cattle were slaughtered and longissimus thoracic muscles were removed from the carcasses then aged at 4℃ for 6 h, 12 h, 24 h, 72 h, 120 h and 168 h. At the end of each storage period, ROS content, lysosomal membrane stability, cathepsins activities, mitochondrial membrane permeability, the expression of AIF and nuclear morphology were measured. The results suggested that ROS content was decreased from 0 h to 6 h, but it was significantly increased from 6 h to 168 h during postmortem aging ($P < 0.05$). Lysosomal membrane stability was significantly decreased from 0 h to 168 h ($P < 0.05$). Cathepsin B, D and L activities were increased as the postmortem aging was increased ($P < 0.05$). Mitochondrial membrane permeability was significantly increased during postmortem aging ($P < 0.05$). The AIF level in mitochondria was significantly increased from 0 h to 12 h and decreased as the postmortem aging was increased, the amount of AIF in the nucleus was increased during postmortem aging ($P < 0.05$). The volume of cell nucleus was gradually increased and some nucleus were dissolved and broken during bovine postmortem aging. It was concluded that the generation of ROS may lead to imbalance of lysosomal membrane stability, and then cathepsins were released to cytoplasm. Subsequently, the mitochondrial outer membrane was permeabilized, and AIF was translocated to the cytosol and nucleus, where it induced apoptosis of nucleus.

Key words: bovine; postmortem aging; lysosomal cathepsins; apoptosis-inducing-factor; apoptosis

收稿日期: 2017-07-30 修回日期: 2017-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560463、31460402)和国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38)

作者简介: 张佳莹(1992—),女,博士生,主要从事畜产品加工研究,E-mail: 610391858@qq.com

通信作者: 余群力(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事畜产品加工研究,E-mail: yuqunlihl@163.com

0 引言

细胞凋亡已知有 3 条发生途径:第 1 条途径涉及细胞色素 c (Cytochrome c, Cyt-c) 的释放及半胱氨酸蛋白酶家族 (Caspase) 效应酶 Caspase-3 的激活,称为内源线粒体途径;第 2 条由 Caspase-8 和 Caspase-10 的激活所介导,称为外源死亡受体途径;第 3 条,即激活 Caspase-12 介导凋亡的发生,称为内质网应激途径^[1]。宰后成熟过程中肉的嫩化是一个复杂的生化过程,而用细胞凋亡理论来解释肉类宰后嫩化机制是当前研究的热点^[2]。动物屠宰后,切断了肌肉组织与外界环境的主要沟通,骨骼肌由于缺血缺氧而迅速发生细胞凋亡,这一凋亡过程依赖于内源线粒体途径。因此,线粒体途径的研究仍然是肉类科学领域的热点。ORRENIUS^[3]表明线粒体对细胞凋亡的调控发挥至关重要的作用,指出位于线粒体内膜的不同促凋亡蛋白释放到胞浆中介导凋亡发生。

目前,线粒体途径比较明确的是 Cyt-c 介导的 Caspase 依赖性途径,即 Cyt-c 释放到胞浆后,在 dATP 存在的条件下与凋亡相关因子-1 (Apaf-1) 结合,使其形成多聚体,并促使 Caspase-9 与其结合形成凋亡小体。Caspase-9 被激活后活化下游效应酶 Caspase-3,诱导细胞凋亡的发生^[4]。这条途径在宰后成熟过程及细胞培养中都已得到广泛的研究^[5-6]。但是,在某些凋亡模型中,Caspase 的广谱抑制剂并不能完全阻止细胞凋亡的发生,由此出现了另外一条独立于 Caspase 的线粒体凋亡途径,即凋亡诱导因子 (AIF) 途径^[7]。AIF 能够从线粒体中释放并进一步引发细胞核裂解。然而,在牛肉宰后成熟过程中,AIF 是否发生了表达并介导细胞核发生凋亡,目前尚不清楚。

除线粒体外,研究表明溶酶体与凋亡信号密切相关^[8]。在某些病理条件下或者细胞成熟老化过程中,溶酶体完整性受到破坏,造成溶酶体蛋白酶如组织蛋白酶的释放,这些蛋白酶直接或间接导致线粒体膜通透性发生改变,使线粒体促凋亡因子释放到胞质中,诱导细胞发生凋亡^[9]。ZUZARTE-LUIS 等^[10]在研究胚胎细胞凋亡过程时发现,溶酶体组织蛋白酶有利于线粒体凋亡因子释放到胞浆中,而组织蛋白酶 D 被认为能够诱导 AIF 的释放。但是,溶酶体组织蛋白酶在宰后牛肉成熟期间是否被活化,其参与 AIF 激活的机制如何,国内外未见报道。因此,有必要研究组织蛋白酶参与牛肉宰后成熟过程中 AIF 介导的细胞凋亡过程,为全面阐明线粒体途径提供新机制。

因此,本文研究牛肉宰后成熟过程中活性氧 (ROS) 的生成、溶酶体膜完整性、组织蛋白酶活性、线粒体膜通透性、AIF 的表达及细胞核形态的变化,从而确认 AIF 是否在牛肉宰后成熟期间发生表达并介导细胞凋亡发生,组织蛋白酶是否被活化,最终明确组织蛋白酶参与 AIF 激活机制,以期为牛肉宰后成熟过程中细胞凋亡线粒体途径提供更为全面的研究机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:试验肉牛由甘肃康美现代农牧产业集团有限公司提供。选取发育正常、健康无病、体重均匀 (450 ± 50) kg 的 2~3 岁西门塔尔杂交牛 6 头,宰前禁食 16 h,禁水 2 h。

试验试剂:Tris、Hepes、Anti-AIF 抗体、Triton X-100、Z-Phe-Arg-AMC、Z-Phe-Arg-AMC、DCFH-DA、CHAPS,均属色谱纯,购于 Sigma 公司;蔗糖、醋酸钠、半胱氨酸、NaCl、KCl、EDTA、甘露醇、血红蛋白、Tween 20、显影粉、定影粉、十二烷基磺酸钠、酒石酸钾钠、丙烯酰胺,均属分析纯,购于天津光复科技发展有限公司。

1.2 主要仪器设备

RF5301-PC 型荧光分光光度计,日本岛津公司;H2050R 型冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司;Spectramax M2 型酶标仪,日本岛津公司;YDS-10 型恒温水浴锅,四川西亚化工有限公司;UV2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;JJ-2 型高速组织捣碎机,江苏金坛市亿通电子有限公司;170-8280 型化学发光成像系统,上海天能科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样本采集和制备

肉牛宰后 30 min 内取其背最长肌为试验对象,随后从背最长肌取下约 15 g 样品,用锡箔纸包裹,立即放入液氮中,作为 0 h 的样品。其余 90 g 肉样真空包装置于冰袋中,45 min 内运回实验室,于 4℃ 条件下分别成熟 6、12、24、72、120、168 h,作为常规成熟样品。在每个成熟时间点,与 0 h 作相同的处理。所有样本贮藏于 -80℃ 待测。

1.3.2 ROS 含量

参照张玉林^[11]的研究方法。0.5 g 肌肉样本放入 3 mL 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA-2Na, 0.008 g/mL NaCl, pH 值 7.4) 中破碎,12 000 r/min 匀浆 1 min,匀浆液于 3 000 g、4℃ 离心 15 min,收集上清液,双缩脲法测定

上清液蛋白浓度。随后,取上清液 100 μL ,与 100 μL 反应缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA-2Na, 0.008 g/mL NaCl, 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, pH 值 7.4)在酶标板内迅速混合,酶标仪测定其荧光值。上述混合液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,测定其荧光值,ROS 相对含量计算公式为

$$C_{\text{ROS}} = W(F_2 - F_1) / F_T$$

式中 C_{ROS} ——ROS 相对含量,mg/(L·min)

F_2 ——孵育后的荧光值

F_1 ——孵育前的荧光值

F_T ——孵育时间,min

W ——蛋白质量浓度,mg/L

1.3.3 溶酶体膜稳定性

采用差速离心法分离肌肉组织溶酶体。1 g 肌肉样本置于预冷的 0.25 mol/L 蔗糖-Tris 缓冲液中破碎,洗去残余血液,加入 9 mL 蔗糖-Tris 溶液匀浆,匀浆液于 1 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上清液再于 10 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,收集上清液,用于游离组织蛋白酶 D 的测定(表示溶酶体外的酶活性)。用 0.1% Triton X-100 重新悬浮沉淀物,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min,再于 10 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清液用于测定结合的组织蛋白酶 D 活性(表示存在于溶酶体内的酶活性),计算游离酶活性与结合活性两者之间的百分比,即溶酶体膜稳定性。

1.3.4 组织蛋白酶活性

参照 TIAN 等^[12]方法,并稍作修改。50 g 肌肉样本切碎后置于 2 倍体积预冷匀浆液(50 mmol/L 醋酸钠,pH 值 5.0,含 7 mmol/L 半胱氨酸,0.9 mmol/L 苯甲基磺酰氟)中,匀浆后搅拌 2 h 并于 12 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,收集上清液贮藏于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 用于组织蛋白酶活性测定。采用双缩脲法测定蛋白浓度。组织蛋白酶 L、B 活力测定方法如下:反应体系由 298 μL 反应混合液(16 μL 0.05 g/mL Brij-35, 6 μL 0.05 g/mL CHAPS, 1 μL 1.4 mol/L 2-巯基乙醇, 5 μL 荧光底物,70 μL 0.4 mmol/L 乙酸,200 μL 蛋白提取液)组成。40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min 后加入荧光底物 Z-Phe-Arg-AMC (L)和 Z-Phe-Arg-AMC (B)。反应 30 min 后加入 3.0 mL 0.1 mol/L 的乙酸钠终止反应,在激发波长 380 nm、发射波长 460 nm 条件下测定荧光强度。酶活力单位(U)定义为每分钟内催化 1 μmol 底物转化为产物所需的酶量。组织蛋白酶 D 活力测定方法如下:反应体系由 1 000 μL 反应混合液(250 μL 0.02 g/mL 血红蛋白,250 μL 0.2 mmol/L 乙酸,500 μL 蛋白提取液)组成。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后加入 125 μL 10% 三氯乙酸终止反应,595 nm 处测定吸光度。酶活力单位(U)用每分钟每克肉样的

吸光度来表示。

1.3.5 线粒体膜通透性

参照陈骋等^[13]的方法。10 g 肉样切碎后加入 100 mL 分离液(250 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA,pH 值 7.4),12 000 r/min 转速下匀浆 2 min,于 1 500 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,收集上清液再次在 12 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 20 min,所得沉淀即为线粒体。将线粒体沉淀与 5 mL 测试介质(230 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖和 3 mmol/L Hepes,pH 值 7.4)混合,使用前用测试介质稀释至 3 mg/mL 蛋白质量浓度。迅速将稀释好的线粒体溶液 300 μL 加入到 2 700 μL 测定介质中,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min 后,以 3 mL 测定介质作为对照,于 540 nm 波长下测定吸光度。

1.3.6 AIF 蛋白表达

采用 12.5% 的分离胶和 4% 的浓缩胶。取蛋白样品上样,每条泳道上样 100 μg 总蛋白,电泳分离后将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上,PVDF 膜在含 5% 脱脂奶粉的 TTBS (0.05% Tween 20, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, pH 值 7.5)溶液中室温(20 $^{\circ}\text{C}$)下封闭 1 h。加入适量一抗,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h。将膜取出放入 TBST 洗膜盒中,在室温条件下清洗 3 次,每次 10 min,随后采用 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白抗体于室温条件下孵育 1 h,再次清洗 3 次,将其放入化学发光成像系统成像。

1.3.7 细胞核 HE 染色

不同成熟时间点的样本在 10% 的福尔马林溶液中固定 24 h,脱水、石蜡包埋后切成 10 μm 的组织切片,固定于经 APES 包被的载玻片上,晾片 5 min 后苏木精染色 3 min,二甲苯通透,中性树胶封片。制备好的玻片在显微镜下进行观察,并对细胞核形态进行拍照。

1.3.8 统计分析

试验结果用 SPSS 19.0 软件进行方差分析($P < 0.05$),Origin 8.0 软件制图。所有结果均采用平均值 \pm 标准差来表示,至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 ROS 相对含量

由图 1 可知,牛肉在宰后成熟过程中 ROS 相对含量呈现先降低后上升的趋势。宰后 6 h,ROS 相对含量显著降低($P < 0.05$),随着成熟时间的延长,ROS 相对含量呈现升高的趋势($P < 0.05$),直至宰后 120 h 后无显著变化。

2.2 溶酶体膜稳定性

由图 2 可知,宰后牛肉成熟过程中溶酶体膜稳

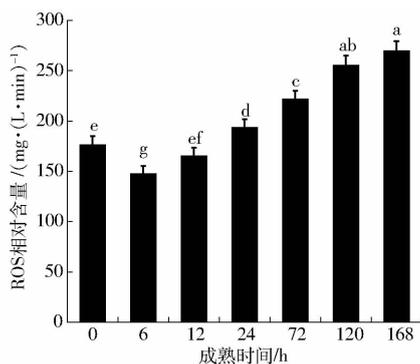


图1 牛肉宰后成熟过程中 ROS 相对含量变化
Fig. 1 Changes in ROS content of bovine muscle during postmortem aging

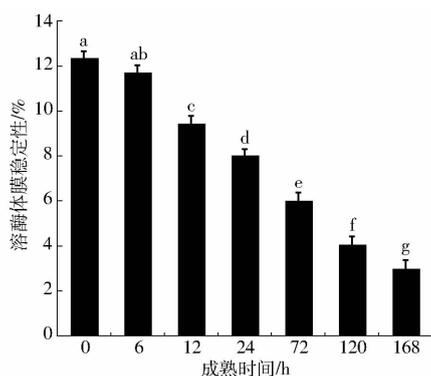


图2 牛肉宰后成熟过程中溶酶体膜稳定性变化
Fig. 2 Changes in lysosomal membrane stability of bovine muscle during postmortem aging

定性呈现逐渐降低的趋势。宰后 0~6 h,溶酶体膜稳定性没有显著差异,随着宰后成熟时间的增加,溶酶体膜稳定性显著降低($P < 0.05$)。

2.3 组织蛋白酶活性

由图3可知,牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶 B、D 和 L 的活力呈上升的趋势。宰后 0~6 h,组织蛋

白酶活力均无显著性变化,随着成熟时间的延长,三者的活力均显著升高($P < 0.05$)。组织蛋白酶 B 活力从宰后 0 h 的 134.75 U 上升至宰后 168 h 的 219.28 U,组织蛋白酶 D 活力从宰后 0 h 的 0.173 U 上升至宰后 168 h 的 0.829 U,组织蛋白酶 L 活力从宰后 0 h 的 1484.13 U 上升至宰后 168 h 的 1923.39 U。

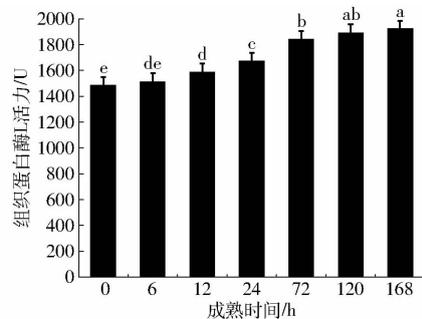
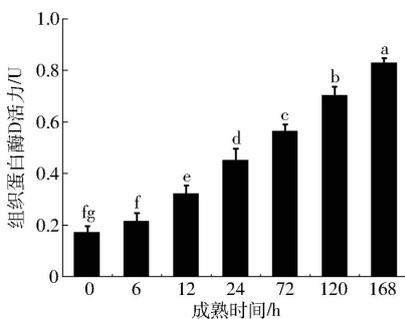
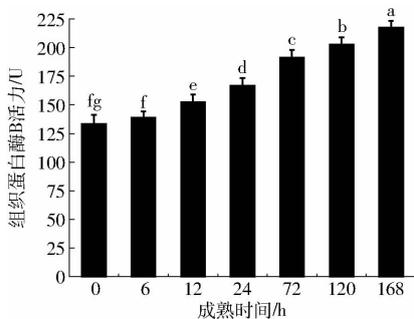


图3 牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 L 活力变化
Fig. 3 Changes in cathepsins B, D and L activities of bovine muscle during postmortem aging

2.4 线粒体膜通透性

由图4可知,线粒体悬浮液在 520 nm 处的吸光度呈现降低的趋势,说明牛肉宰后成熟过程中线粒体膜通透性逐渐增大。宰后 0~6 h,线粒体膜通透性变化不显著,6~12 h 线粒体膜通透性显著升高($P < 0.05$),之后随着成熟时间的延长,线粒体膜通透性呈增大的趋势,但变化并不显著。

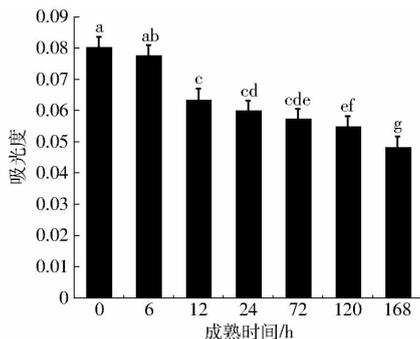


图4 牛肉宰后成熟过程中线粒体膜通透性变化
Fig. 4 Changes in mitochondrial membrane permeability of bovine muscle during postmortem aging

2.5 凋亡诱导因子蛋白表达

由图5可知,宰后 0~12 h 牛肉中 AIF(凋亡诱导因子)在线粒体中的表达量显著增加($P < 0.05$),而在宰后 12~168 h 的成熟时间中,AIF 的表达量显著降低。宰后牛肉成熟过程中 AIF 在细胞核中的表达量呈上升的趋势。宰后 6 h 没有显著变化,6~12 h 显著增加($P < 0.05$),在随后的成熟时间里基本没有显著变化。

2.6 细胞核形态

由图6可知,采用 HE 染色法对宰后成熟过程中的牛肉细胞核进行检测,DAPI 染料将细胞核标记为蓝色荧光。宰后 0~168 h 成熟过程中,细胞核体积逐渐增大,部分核溶解,并伴随着细胞皱缩、细胞间隙变大的现象。

3 讨论

近年来,由于线粒体 Caspase 依赖性途径与宰后肉类嫩化密切相关,因此成为研究的热点。尽管

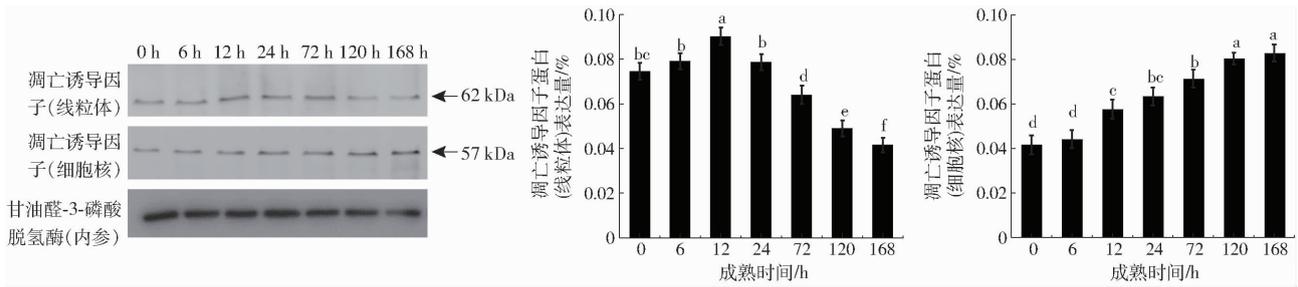


图5 牛肉宰后成熟过程中凋亡诱导因子表达分析

Fig. 5 Western blotting analysis of relative changes in expression of AIF of bovine muscle during postmortem aging

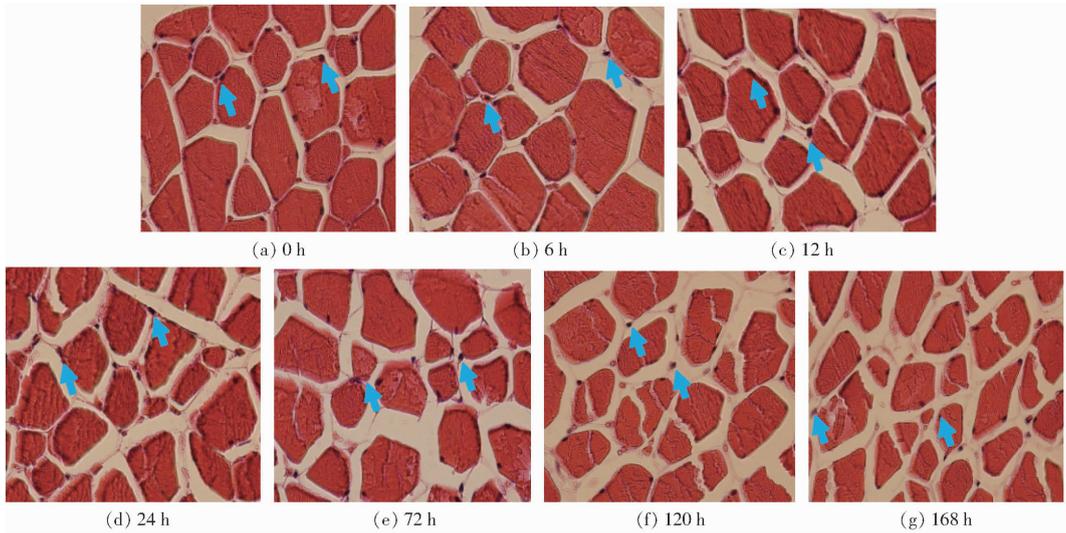


图6 牛肉宰后成熟过程中细胞核形态变化

Fig. 6 Changes in nuclear morphology of bovine muscle during postmortem aging

之前有研究报道了宰后成熟过程中 Cyt-c 介导的 Caspase 依赖性线粒体途径^[14-15],但是线粒体凋亡途径是极其复杂的,因此宰后成熟过程中牛肉骨骼肌的凋亡途径及机制仍存在争议。线粒体除释放 Cyt-c 外,还能释放其它蛋白(如 AIF)诱导凋亡的发生。那么,牛肉在宰后成熟过程中,线粒体 AIF 蛋白是否被激活从而介导凋亡的发生,组织蛋白酶是否被活化,其参与 AIF 激活的机制如何,目前并不清楚。因此本文旨在研究牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶参与 AIF 释放及线粒体 AIF 激活并介导细胞凋亡发生的机制。

ROS 的产生是不可避免的,宰后成熟过程引起细胞内 ROS 的增加,使细胞处于氧化应激状态。本试验中,宰后 6 h ROS 相对含量降低,可能与肌细胞中抗氧化酶的存在有关。宰后初期,细胞液中的谷胱甘肽还原系统及超氧化物歧化酶会清除部分 ROS,而随着成熟时间的延长,细胞内环境逐渐恶化,抗氧化酶活性降低甚至完全失活,还原系统也遭到破坏,导致后期 ROS 在细胞的大量堆积^[16]。此外,ROS 在概念上类似于其他信号物质,如 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 能够作用于线粒体,影响其通透性的改变,从而引发细胞凋亡。同样,ROS 的大量累积,造成组织

器官失常,诱导凋亡发生^[17]。WANG 等^[18] 在研究线粒体凋亡因子对宰后成熟过程中牦牛肉嫩度影响时表明,宰后成熟过程中 ROS 的含量显著增加,改变了线粒体电子呼吸链,加速了细胞凋亡的发生。CAI 等^[19] 指出在多种细胞凋亡因素的刺激下,细胞内 ROS 的增加导致溶酶体膜通透和细胞死亡。因此,宰后成熟过程中牛肉细胞 ROS 含量增加,可能刺激溶酶体膜稳定性发生变化。

研究发现,溶酶体在细胞凋亡中起着重要作用。在氧化应激条件下,溶酶体酶能够激活细胞凋亡酶,预示着溶酶体参与细胞凋亡的调控,至此,溶酶体在细胞凋亡过程中的重要作用才得到广泛的关注^[20]。溶酶体诱导凋亡的关键步骤是溶酶体膜失稳,导致溶酶体蛋白酶释放到胞浆中启动凋亡的发生。本文研究结果表明,宰后牛肉成熟过程中,溶酶体膜的稳定性逐渐降低。REPNIK 等^[21] 研究表明造成溶酶体膜稳定性失衡的因素有很多,其中研究最广泛的就是 ROS。组织蛋白酶存在于溶酶体细胞器中,帮助维持细胞新陈代谢。当溶酶体膜失稳后,组织蛋白酶释放到胞浆中,启动溶酶体凋亡通路。本试验结果表明,组织蛋白酶 B、D 和 L 的活力随着宰后成熟时间的延长显著增大。这可能是由于组织蛋白酶是

一种存在于溶酶体中的酶。宰后初期,因为其没有完全从溶酶体中释放出来,所以活性较低。随着成熟时间的延长,溶酶体膜稳定性被破坏,组织蛋白酶随之从溶酶体中释放出来,活性升高。这与田甲春^[22]研究结果相一致。此外,溶酶体膜的损伤会选择性释放一些组织蛋白酶,进而导致细胞发生凋亡。因此,宰后成熟过程中牛肉溶酶体膜稳定性降低,导致组织蛋白酶从溶酶体释放出来从而被活化,进而诱导凋亡反应的发生。

溶酶体组织蛋白酶凋亡途径,被认为是通过线粒体进行的^[23]。而线粒体膜通透性是线粒体释放相关蛋白的关键步骤。本文研究结果表明,随着宰后成熟时间的延长,线粒体膜通透性逐渐增大。这一结果与 HOFER 等^[24]在研究动物宰后成熟时期线粒体膜通透性变化结果相一致。宰后 6 ~ 12 h,线粒体膜通透性变化显著,可能与这一时间段是凋亡相关蛋白释放的主要时期有关。ZHANG 等^[25]在研究牛肉宰后成熟过程 Cyt-c 介导凋亡发生时也认为,线粒体膜通透性随着成熟时间的延长而增大,这与 Cyt-c 的释放密切相关。同时,SUN 等^[26]研究认为组织蛋白在细胞中诱导凋亡发生是通过线粒体膜的通透和 AIF 的核转位来实现的。

对于凋亡组织而言,线粒体膜发生通透,AIF 从线粒体移位到细胞核中,诱导细胞核发生凋亡。

AIF 在多种死亡过程中作为一种重要的诱导因子^[27]。与这一理论相一致,本文研究结果表明,宰后成熟过程中牛肉 AIF 从线粒体释放到细胞核中,活化的 AIF 诱导细胞核发生凋亡。宰后 0 ~ 12 h, AIF 在线粒体中的表达量增加,可能是线粒体 AIF 的生成速度大于释放速度。宰后 12 ~ 168 h, AIF 在线粒体中的表达量减少,这与其在细胞核中的表达量增加相一致。TERMAN 等^[28]研究表明溶酶体组织蛋白酶有利于线粒体 AIF 释放到胞浆中,继而进入核内,诱发细胞核发生变化,这一过程甚至发生在细胞凋亡酶未被激活的情况下。JOHANSSON 等^[29]研究也表明释放到胞质中的组织蛋白酶又能够促进线粒体中 AIF 及 Cyt-c 的释放,进而诱导凋亡。

4 结束语

牛肉宰后成熟过程中 ROS 相对含量先降低后升高,溶酶体膜稳定性降低,组织蛋白酶 B、D 和 L 的活力逐渐增大,线粒体膜通透性增大,AIF 从线粒体释放到细胞核中,细胞核体积增大,部分核溶解,并伴随着细胞间隙变大的现象。说明牛肉在宰后成熟过程中生成 ROS,ROS 的累积导致溶酶体膜稳定性失衡,使组织蛋白酶被释放,作用于线粒体,随后线粒体膜通透性发生变化,释放 AIF,活化的 AIF 进入细胞核内诱导凋亡发生。

参 考 文 献

- 1 BECILA S, HERRERA-MENDEZ C, COULIS G, et al. Postmortem muscle cells die through apoptosis[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(3): 485 - 493.
- 2 孙志超, 冯晓琴, 韩玲, 等. 牦牛肉宰后成熟嫩化与细胞凋亡酶活力变化研究[J/OL]. *农业机械学报*, 2014, 45(1): 191 - 196. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20140130&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2014.01.030.
- 3 SUN Zhichang, FENG Xiaoqin, HAN Ling, et al. Tenderness and apoptotic activity of yak meat during postmortem aging[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(1): 191 - 196. (in Chinese)
- 4 ORRENIUS S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. *Toxicology Letters*, 2004, 149(1 - 3): 19 - 23.
- 5 HUANG F, HUANG M, ZHANG H, et al. Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 110 - 114.
- 6 CAO J X, SUN W Q, ZHOU G H, et al. Morphological and biochemical assessment of apoptosis in different skeletal muscles of bulls during conditioning[J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88(10): 3439 - 3444.
- 7 王琳琳, 马君义, 余群力, 等. 宰后牦牛肉细胞凋亡对肌肉内环境与嫩度的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2017, 48(7): 317 - 324. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170740&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.07.040.
- 8 WANG Linlin, MA Junyi, YU Qunli, et al. Effects of apoptosis on muscle internal environment and tenderness during yak meat postmortem aging[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(7): 317 - 324. (in Chinese)
- 9 SUSIN S A, LORENZO H K, ZAMZAMI N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 441 - 446.
- 10 BOYA P, KROEMER G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6434 - 6451.
- 11 AITS S, JAATTELA M. Lysosomal cell death at a glance[J]. *Cell Science*, 2013, 126(9): 1905 - 1912.
- 12 ZUZARTE-LUIS V, MONTERO J A, KAWAKAMI Y, et al. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death[J]. *Developmental Biology*, 2007, 301(1): 205 - 217.
- 13 张玉林. 宰后活性氧簇(ROS)的形成对鹅肉品质影响机制的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.

- ZHANG Yulin. The mechanism of the influence on meat quality of goose muscle caused by the generation of reactive oxygen species (ROS) after slaughter[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014. (in Chinese)
- 12 TIAN J C, HAN L, YU Q L, et al. Changes in tenderness and cathepsins activity during post mortem ageing of yak meat[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2013, 93(3): 321 – 328.
- 13 陈骋, 余群力, 韩玲, 等. 丙二醛对牛肉线粒体高铁肌红蛋白还原能力的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2015, 46(12): 253 – 259. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20151234&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.12.034.
- CHEN Cheng, YU Qunli, HAN Ling, et al. Effects of malondialdehyde on metmyoglobin reduction ability of bovine muscle mitochondria[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(12): 253 – 259. (in Chinese)
- 14 PETROSILLO G, RUGGIERO F M, PISTOLESE M, et al. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis[J]. FEBS Letters, 2001, 509(3): 435 – 438.
- 15 CHEN L, FENG X C, LU F, et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca^{2+} on Caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during postmortem ageing[J]. Meat Science, 2011, 87(3): 165 – 174.
- 16 XUE D, LI Y N, JIANG Z J, et al. A ROS-dependent and Caspase-3-mediated apoptosis in sheep bronchial epithelial cells in response to *Mycoplasma ovipneumoniae* infections[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2017, 187: 55 – 63.
- 17 ZHANG R F, HUMPHREYS I, SAHU R P, et al. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway[J]. Apoptosis, 2008, 13(12): 1465 – 1478.
- 18 WANG L L, HAN L, MA X L, et al. Effect of mitochondrial apoptotic activation through the mitochondrial membrane permeability transition pore on yak meat tenderness during postmortem aging[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 323 – 331.
- 19 CAI J Y, YANG J, JONES D P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1366(1 – 2): 139 – 149.
- 20 LUZIO J P, PRYOR P R, BRIGHT N A. Lysosomes: fusion and function[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(8): 622 – 632.
- 21 REPNIK U, STOKA V, TURK V, et al. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1824(1): 22 – 33.
- 22 田甲春. 牦牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶 L、B、H 对肉品质及微观结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- TIAN Jiachun. The effect of cathepsins L, B, H on yak meat quality and microstructure during postmortem aging[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- 23 REPNIK U, TURK B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death[J]. Mitochondrion, 2010, 10(6): 662 – 669.
- 24 HOFER T, SERVAIS S, SEO A Y, et al. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2009, 130(5): 297 – 307.
- 25 ZHANG J Y, YU Q L, HAN L, et al. Study on the apoptosis mediated by cytochrome c and factors that affect the activation of bovine longissimus muscle during postmortem aging[J]. Apoptosis, 2017, 22(6): 777 – 785.
- 26 SUN H W, YANG S, LI J H, et al. Caspase-independent cell death mediated by apoptosis-inducing factor (AIF) nuclear translocation is involved in ionizing radiation induced HepG2 cell death[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 472(1): 137 – 143.
- 27 NORBERG E, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 396(1): 95 – 100.
- 28 TERMAN A, GUSTAFSSON B, BRUNK U T. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death[J]. Chemico-Biological Interactions, 2006, 163(1 – 2): 29 – 37.
- 29 JOHANSSON A C, APPELQVIST H, NILSSON C, et al. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization[J]. Apoptosis, 2010, 15: 527 – 540.