

# 转线粒体细胞模型

李继霞 刘一农 王 钜\*

(首都医科大学医学实验动物科学系, 北京 100054)

**摘要** 转线粒体细胞模型是由无线粒体 DNA (mtDNA) 细胞与 mtDNA 供体通过融合的方法而形成的融合细胞。随着转线粒体技术的发展, 制备该细胞模型的方法也多种多样。现今, 转线粒体模型的应用十分广泛, 不仅可应用于线粒体相关疾病的基础研究, 而且在线粒体相关疾病的临床研究中也发挥了重要的作用。融合细胞具有一致的核背景, 可以消除核基因的作用, 因而有助于判断 mtDNA 突变的致病作用及机制和线粒体缺陷的致病作用及机制。此外, 利用该模型还可作为探讨线粒体相关疾病基因治疗和筛选疾病治疗药物的有效模型。

**关键词** 线粒体; 线粒体 DNA; 细胞模型; 融合细胞

线粒体是存在于所有真核细胞中的一种细胞器, 通过电子传递链的氧化磷酸化反应为有机体生成 90% 的 ATP 能源, 历来被生物学家誉为细胞的“电站”。线粒体还有多种极为重要的新功能, 包括产生超氧阴离子等活性氧自由基、调节细胞氧化还原电势和信号转导、调控细胞凋亡和基因表达, 并在生长、发育、代谢、衰老、疾病、死亡以及生物进化等多方面都有重要意义。人线粒体 DNA(mtDNA) 由 16 569 bp 组成, 具环状双链结构, 编码 13 个呼吸链亚单位, 2 个 rRNA 和 12 个 tRNA。重链编码了 2 个 rRNA, 12 个多肽和 14 个 tRNA 分子, 轻链编码了 1 个多肽(ND6, NADH 脱氢酶亚单位 6)和 8 个 tRNA 分子。随着分子生物学技术的发展, 人们先后在线粒体肌病、线粒体脑肌病、2 型糖尿病、退行性疾病、癌症等患者的组织细胞中都发现了线粒体功能缺陷和 mtDNA 的突变。自 1988 年首次报道致病性 mtDNA 突变以来, 至今已发现至少有 100 多个点突变和大量的缺失突变与重复突变。线粒体功能缺陷和 mtDNA 突变业已成为线粒体相关疾病的重要病因。当前由于缺乏人工诱导或转入特征性小鼠细胞突变 mtDNA 的技术从而限制了 mtDNA 突变细胞和动物模型的开发, 为研究线粒体相关疾病的发病机制、诊断和治疗等方面带来了困难<sup>[1]</sup>。近年发展起来的转线粒体技术为解决这一难题提供了希望。鉴于转线粒体细胞模型在线粒体和线粒体相关疾病研究方面应用的广泛性, 本文就该模型的建立方法和应用作一综述。

## 1 转线粒体细胞模型的建立

转线粒体细胞模型的建立(图 1)<sup>[2]</sup>是由 mtDNA 供体与无 mtDNA 细胞通过融合的方法而形成的细胞质杂交(cytoplasmic hybrid, cybrid)细胞, 从而引入外源性目的 mtDNA, 用选择培养基挑出杂交细胞, 然后采用一系列方法来评价杂交细胞的功能表现和外源性目的 mtDNA 的生物致病机制。

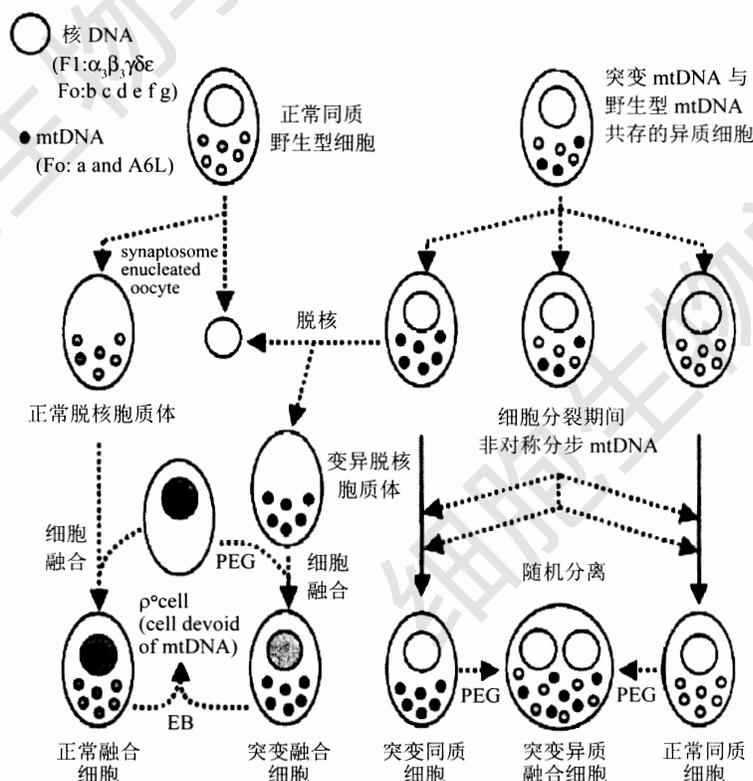
### 1.1 融合法介导的转线粒体细胞模型

King 等<sup>[3]</sup>首先成功的应用融合法而引入外源性 mtDNA, 建立了转线粒体细胞模型, 开创了经典的转线粒体细胞模型构建方法。他们第一步是通过将 143B-K-细胞在含有 50 ng/ml 低剂量溴化乙锭(EB)的培养基中培养 34 周后, 首先建立了无 mtDNA 的  $\rho^{\circ}206$  细胞。主要原理是由于扁平状的 EB 分子可以插入无组蛋白保护的 mtDNA 分子层状排列的碱基对之间, 抑制 mtDNA 复制而致细胞内 mtDNA 丢失, 从而造成  $\rho^{\circ}206$  细胞内有线粒体但无 mtDNA。第二步是利用机械法将细胞脱核。在细胞松弛素 B (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在的条件下, 通过离心使细胞脱核形成脱核胞质体(enucleated cytoplasm)。细胞松弛素 B 的主要作用是破坏细胞骨架。由于细胞黏附特性的不同, 所以并非所有细胞系都可采用此法脱核, 这使得融合法的应用受到了限制。第三步是利用聚乙二

收稿日期: 2005-06-27 接受日期: 2005-08-11

北京市科委 248 重大创新工程资助项目

\* 通讯作者。Tel/Fax: 010-83911316, E-mail: wangju53@263.net

图1 转线粒体融合细胞模型的构建<sup>[2]</sup>

醇(polyethylene glycol, PEG)将无 mtDNA 的  $\rho^0$  细胞和脱核胞质体融合。第四步是利用选择培养基选择融合细胞。 $\rho^0$  细胞的嘧啶依赖性以及胸苷激酶阴性,在细胞融合时构成一对很好的筛选条件,严格的选择培养基中应该不含嘧啶和丙酮酸,此时  $\rho^0$  细胞死亡,外源的胸苷激酶阳性的细胞被 BRdU 杀死,只有融合细胞才能够生存下来。挑出的融合细胞即是实验中所需的转线粒体细胞。

随着胞质杂交技术的应用和发展, Trounce 等<sup>[4]</sup>又建立了一种新的产生无 mtDNA 细胞的方法。他们利用罗丹明 6-G (rhodamine 6G, R-6G)对细胞进行预处理可以生成无 mtDNA 细胞,在融合法中可替代  $\rho^0$  细胞。R-6G 是一种对线粒体有毒性作用的染料,用其对受体细胞进行预处理可以抑制受体细胞生长并破坏 mtDNA,但细胞仍能保持生存能力,并不妨碍细胞存活。利用 R-6G 预处理细胞所构建的转线粒体细胞系能携带种种不同的 mtDNA。Levy 等<sup>[5]</sup>为产生胚胎干细胞融合细胞,利用 R-6G (溶于 3% 乙醇)处理胚胎干细胞(CC9.3.1),以清除内源性氯霉素敏感 mtDNA(CAPS),然后通过电融合的方法与去核的氯霉素抗性(CAPR)的小鼠细胞进行细胞

质杂交,这样干细胞中的 CAPS mtDNA 就被 CAPR mtDNA 替代。Petros 等<sup>[6]</sup>从病人淋病细胞分离出含有 mtDNA 突变(T8993T/G)的异质细胞,采用机械法使其脱核形成脱核胞质体,接着再与无 mtDNA 143B 细胞(TK<sup>-</sup>)融合而形成同质 T8993G 变异型和同质 T8993T 野生型融合细胞株,然后变异型和野生型 143B 融合细胞株在 Ficoll- 细胞松弛素 B 作用下脱核,用 5  $\mu\text{g/ml}$  R-6G 处理 PC3 前列腺癌细胞 7 天后获得了无 mtDNA 前列腺癌细胞,将脱核的变异型和野生型 143B 细胞与 R-6G 预处理过的 PC3 细胞融合,最终形成了带有 mtDNA 突变的前列腺癌融合细胞。他们又将  $10^6$  个 PC3 (mtDNA T8933T/G) 融合细胞注射在 6 周龄雌性裸鼠的肩胛骨附近,以便观察融合细胞的致瘤性,最后实验结果表明 mtDNA 突变能抑制电子传递链,增加活性氧(ROS)产物,促进癌细胞生长,在肿瘤起始和发展过程中发挥了作用,说明癌症也属线粒体相关疾病的范畴。

2003 年,在脱核胞质体生成技术上有了新的突破。Bayona-Bafaluy 等<sup>[7]</sup>首先建立了一种新的有效简单的化学脱核法(图 2)。化学法的主要原理:放射菌素 D (来源于 *Streptomyces antibioticus*)是一种抗生

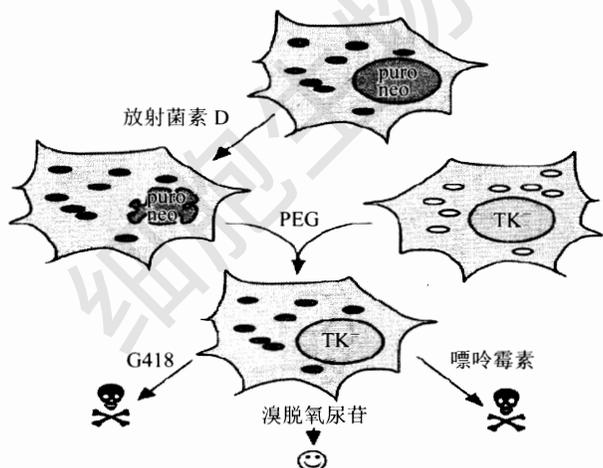


图2 利用化学脱核法将 mtDNA 转入  $\rho^-$  细胞<sup>[7]</sup>

放射菌素 D 处理 mtDNA 供体细胞后, 形成了含有退化核的细胞, 该种细胞适宜为 mtDNA 供体, 然后与  $\rho^-$  细胞通过 PEG 融合形成转线粒体融合细胞。融合细胞克隆是通过无核选择(它们在缺乏尿苷的培养基被分离, 缺乏尿苷的培养基抑制了  $\rho^-$  细胞的生长)而获得的, 稍后对融合细胞克隆分别进行抗 G418、嘌呤霉素和溴脱氧尿苷(BrdU)检测, 融合细胞能抗 BrdU, 而对 G418、嘌呤霉素敏感, 在含 G418 和嘌呤霉素培养基中死亡。

素, 具有苯环结构。该结构能插入 DNA 双链, 尤其是 GC 碱基, 从而干扰了 DNA 复制、转录酶的活性, 致使核基因复制转录失活, 清除该试剂后, 细胞核也不能恢复正常。利用此试剂对细胞进行低剂量长时间的作用可使得细胞核发生不可逆性死亡, 而胞质 mtDNA 仍保持正常活性。他们发现 0.5  $\mu\text{g/ml}$  放射菌素 D 处理永生化的成纤维细胞 15 h 后, 细胞核发生了不可逆的死亡, 而胞质仍存活, 因此放射菌素 D 处理过的细胞可与无 mtDNA 的瓣细胞通过 PEG 融合能形成胞质杂交细胞。化学脱核法需要根据不同的细胞系来调整实验条件达到最佳的脱核效果。化学法与机械法相比, 主要优点是: (a) 只要条件选取合适, 任何细胞类型都可被脱核生成胞质体; (b) 脱核效率高, 方法简便, 省时省力; (c) 允许任何无 mtDNA 细胞作为 mtDNA 受体细胞。

除脱核胞质体外, 血小板和突触体也可为无 mtDNA 受体细胞提供外源 mtDNA。1994 年, Chomyn 等<sup>[8]</sup>首先从患者血液中提取血小板作为外源 mtDNA 供体, 与缺乏 mtDNA 的  $\rho^-$  细胞融合建立了转线粒体细胞模型, 应用该模型分析了细胞中线粒体呼吸功能损害与线粒体脑肌病伴有破碎红纤维的肌阵挛癫痫(MERRF)患者 mtDNA 突变的关系。此后, 这类模型被广泛应用于分析神经变性疾病中遗

传性或氧自由基造成的线粒体基因突变的致病作用及机制。国内应用该模型研究线粒体相关疾病相对较晚, 孟洪弟等<sup>[9]</sup>采用 PEG 融合技术将 Rett 综合征患儿及正常对照组儿童血小板与瓣细胞融合, 构建出融合细胞模型。他们取  $10^7$  个血小板与  $10^5 \sim 10^6$  个  $\rho^-$  细胞融合, 温育第二天换用选择培养基。由于患者的线粒体中可能存在缺陷, 目前多采用不含嘧啶但含丙酮酸的不严格的选择培养基。通常选择培养 6~7 天后, 未融合细胞大多死亡, 选择培养 10~15 天后可见融合细胞克隆, 然后更换普通培养基培养, 培养 5~6 周后开始其他实验。血小板是巨核细胞的衍生物, 成熟的血小板内无细胞核, 是天然的无核基因, 每个血小板平均含有 4 个线粒体, 每个线粒体内平均有 1 个 mtDNA 分子。血小板作为 mtDNA 供体, 其优点是: (a) 血小板取材容易, 用血量少, 对人体无害; (b) 血小板无细胞核, 作为线粒体供体不必经过复杂的去核过程; (c) 血小板可低温冻存并复苏, 应用较少受时空限制。血小板与  $\rho^-$  细胞融合后, 其胞浆内的物质经融合细胞多次分裂后被不断稀释, 不会对融合细胞产生影响<sup>[10,11]</sup>。

突触体内通常含有 1 个或多个线粒体, 也可作为外源 mtDNA 的供体, 当其与人或小鼠  $\rho^-$  细胞融合后能产生具有活性的融合细胞。Sligh 等<sup>[12]</sup>将脑突触体与小鼠  $\rho^-$  细胞系(LMEB4)融合后在选择培养基中行选择培养, 挑出 LMEB4 融合细胞后采用机械法(Ficoll-细胞松弛素 B)脱核形成脱核胞质体, 然后利用 R-6G 对雌性小鼠 CC9.3.1 胚胎干细胞进行预处理生成无 mtDNA 细胞, 最后将脱核胞质体与 R-6G 预处理的胚胎干细胞混合, 通过电融合的方式产生雌性小鼠胚胎干细胞融合细胞。

## 1.2 显微注射法介导的转线粒体细胞模型

Pinkert 等<sup>[13]</sup>首先利用显微注射的方法成功建立了在异种小鼠间的线粒体转移技术。他们将从 *Mus spretus* (Ms) 系小鼠肝细胞中分离到的活的线粒体显微注入原核期的 *Mus musculus domesticus* (Mm) 系小鼠胚胎中。在经过显微注射的 217 枚受精卵中, 67 枚存活, 其中 23 枚经 4.5 天的体外培养后发育到囊胚。实验结果表明, 经过显微注射的小鼠胚胎在体外培养时, 无论是 0.5 天还是 4.5 天均能检测到外源 mtDNA。Sokolova 等<sup>[14]</sup>从 HepG2 细胞中分离到活的线粒体显微注入小鼠受精卵中, 然后移植到假孕小鼠。研究发现经过显微注射的胚胎移植后发育正常, 体内培养了 13 天的胚胎组织(心脏、骨骼肌和

胃)中可检测到人 mtDNA。目前,显微注射法主要应用于转线粒体小鼠模型开发的研究中。

### 1.3 其他方法

线粒体转移法技术中除了经典的 PEG 融合外,电融合和致融合蛋白(如 Sendai 病毒融合蛋白)也可替代 PEG。现今科学家们也在不断尝试探讨新的线粒体转移方法,主要有:(a)使用基因枪将 mtDNA 转入线粒体或将叶绿体 DNA 转入叶绿体。(b)电转 mtDNA 至线粒体。(c)非病毒载体将 mtDNA 转入细胞,如 DQAsome、DNA 复合体。相信随着对线粒体学和线粒体医学的深入研究,将来势必会发展出多种多样的线粒体转移技术<sup>[2]</sup>。

## 2 转线粒体细胞模型的应用

目前转线粒体细胞模型主要应用于以下几方面:(a)评价核基因的作用,研究核-线粒体基因组的交互作用。线粒体的呼吸功能受到线粒体和核两套基因组共同的支配。线粒体功能的下降可能是由线粒体基因的改变引起的,也可能是由核基因的改变引起的,应用该模型可以解决此问题。Kenyon 等<sup>[15]</sup>采用机械法将不同灵长类成纤维细胞脱核形成 mtDNA 供体,再与人类  $\rho^0$  细胞相融合,建立了异源线粒体融合细胞株,对融合细胞行 DNA 分析、氧耗量和线粒体蛋白合成检测。实验结果发现来源于黑猩猩和大猩猩的融合细胞株在人类核基因背景下能恢复氧化磷酸化功能,而来源于猩猩、新世界猴子和狐猴的融合细胞不能恢复;氧耗量是呼吸功能的敏感指标,黑猩猩和大猩猩能替代人类 mtDNA,恢复呼吸功能至细胞所必须的正常水平;在成功的异源融合细胞系线粒体蛋白合成未有变化。未成功的灵长类融合细胞所来源的 mtDNA 与人类 mtDNA 产生分歧最近在 800 万年至 1800 万年,二者的 mtDNA 存在 1 个或多个突变,影响了关键的核-线粒体基因组交互作用,因此融合细胞不能恢复正常的氧化磷酸化功能。这种细胞模型提供了种间 mtDNA 交换的实证,能够扩展 mtDNA 多态性的数目,为研究核-线粒体交互作用提供了新模型。(b)分析线粒体编码的蛋白质合成缺陷。现已发现多种 mtDNA 点突变融合细胞的线粒体蛋白合成缺陷。mtDNA 编码的 tRNA 是合成线粒体蛋白所必须的分子,因此编码 tRNA 的 mtDNA 突变有可能影响到蛋白质的合成。如:A3243G 突变损害 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 转录;G5703A 突变使得 tRNA<sup>Asn</sup> 下降,损害其氨酰

化能;A4269G 损害 tRNA<sup>Leu</sup> 转录;A8344G 和 G8313A 突变与 tRNA<sup>Lys</sup> 氨酰化能力缺陷有关。在含高百分比 G8313A 突变的融合细胞中发现 tRNA<sup>Lys</sup> 氨酰化和线粒体蛋白合成严重受损<sup>[16,17]</sup>。(c)探讨 mtDNA 的阈值效应和线粒体相关疾病的基因治疗。线粒体疾病突变 mtDNA 多以异质状态存在,既含突变型又含野生型,细胞之间异质程度各不相同,从而使得细胞的能量状态也不同。在减数分裂或有丝分裂异质细胞原浆移动期间,突变和正常的 mtDNA 被不均衡的分配到子细胞中,因此重复细胞分裂过程就可分离出两种同质细胞,即只含有突变 mtDNA 的细胞和只含有野生 mtDNA 的细胞,这种复制分离现象被称为随机分离。随机分离所得的两种同质细胞形成完美对照,可以消除实验过程中的核背景及 mtDNA 多态性的影响。mtDNA 突变具有阈值效应,只有当突变积聚到一定程度才能表现出线粒体疾病的临床症状,因此,可以利用细胞融合的方法将正常胞质中的 mtDNA 转移到线粒体疾病患者细胞中,从而形成 cybrid 细胞,用以互补纠正患者细胞中 mtDNA 的缺陷,使 mtDNA 突变程度小于阈值从而达到治疗疾病的目的。(d)对 mtDNA 突变致病机制的分析。目前已在多种疾病如 MERRF (A8344G, T8356C)、MELAS (A3243G)、CPEO (5196 bp 缺失)、Leigh 综合征(T8993G)、LHON (G14459A)、肿瘤(T8993G)、双极病(bipolar disorder, T3644C)及线粒体肌病(G5703A)等进行了这种线粒体转移实验,从而明确了 mtDNA 突变的致病作用,并对其致病机制进行了深入研究<sup>[6,18-20]</sup>。(e)观测线粒体相关疾病发病机制及筛选药物。李林等<sup>[21]</sup>分离 5 例 AD 病人,6 例 PD 病人和 6 例正常青年人的血小板后,与  $\rho^0$  SH-SY5Y 细胞在 PEG1500 的诱导下融合,经选择培养基选择融合细胞,观察融合细胞的病理特征并观察中药有效成分 SSY-P3 对此种细胞模型的药效学作用。结果发现:融合细胞在选择培养基中生长增殖良好;AD 及 PD 转线粒体细胞模型的细胞氧化酶(COX)活性比正常老年及正常青年对照组低;ROS 水平较对照高,而将中药与 AD 及 PD 融合细胞共温育 24 h 可使它们 ROS 的产生降低;AD 及 PD 融合细胞的线粒体膜电位较对照低,而与中药 SSY-P3 共温育后可使它们的线粒体膜电位(MMP)上升;与对照相比,AD 和 PD 融合细胞的基础细胞内钙水平升高,并且对钙水平的调节能力降低。从上述结果可以看出 AD 和 PD 转线粒体细胞模型可作为观测线

粒体相关疾病发病机制及筛选药物的良好模型。

### 3 展望

迄今为止, 人类已获得了大量由于 mtDNA 突变(错义突变、蛋白质合成突变、插入缺失、多拷贝复制突变)导致代谢及细胞病理发生的证据。mtDNA 突变和线粒体功能紊乱是一些晚发性疾病如 AD、PD、肿瘤、2 型糖尿病等的重要原因。转线粒体细胞模型不仅被广泛的应用于线粒体的基础研究, 而且在线粒体疾病的临床研究中也发挥了重要的作用。该模型极大地促进了突变 mtDNA 致病性的分子病理学和分子遗传学机制的研究工作, 在线粒体相关疾病的研究中有着最广泛的应用前景。

#### 参考文献 (References)

- [1] Hirano M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 401
- [2] Kagawa Y *et al. Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **49**: 107
- [3] King MP *et al. Science*, 1989, **246**: 500
- [4] Trounce I *et al. Somat Cell Mol Genet*, 1996, **22**: 81
- [5] Levy SE *et al. Transgenic Res*, 1999, **8**: 137
- [6] Petros JA *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 719
- [7] Bayona-Bafaluy MP *et al. Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: e98
- [8] Chomyn A *et al. Am J Hum Genet*, 1994, **54**: 966
- [9] 孟洪弟等. *中华儿科杂志*, 2001, **39**: 518
- [10] 刘芳等. *实验生物学报*, 2002, **35**: 243
- [11] 孟洪弟等. *中华医学遗传学杂志*, 2001, **18**: 132
- [12] Sligh JE *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 14461
- [13] Pinkert CA *et al. Transgenic Res*, 1997, **6**: 379
- [14] Sokolova VA *et al. Mol Reprod Dev*, 2004, **68**: 299
- [15] Kenyon L *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 9131
- [16] Hino N *et al. Genes Cells*, 2004, **9**: 243
- [17] Bacman SR *et al. Biochem J*, 2003, **374**: 131
- [18] Finsterer J. *Eur J Neurol*, 2004, **11**: 163
- [19] Munakata K *et al. Genomics*, 2004, **84**: 1041
- [20] Rossignol R *et al. Biochem J*, 2003, **370**: 751
- [21] 李林等. *中国药理学会通讯*, 2002, **19**: 31

## Transmitochondrial Cytoplasmic Hybrid Cellular Model

Ji-Xia Li, Yi-Nong Liu, Ju Wang\*

(Department of Laboratory Animal Science, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China)

**Abstract** Transmitochondrial cytoplasmic hybrid (cybrid) cellular model is obtained by fusing  $\rho^0$  cell line (host) completely devoid of mtDNA with cytoplasts produced by enucleation of cells (donor) derived from patients or controls. With the development of transmitochondrial technique, the methods of establishing cybrid cellular model are various. Now the model has been widely used not only in mitochondrial basic research but also in mitochondrial related diseases' clinical research. Cybrid cells can be studied in the context of a 'neutral' nuclear background. Transmitochondrial cellular model is found extensive application in investigating mtDNA mutation and mitochondrial defect pathogenesis, evaluating the gene expression of mitochondrial genome at different level and screening the drug of treating mitochondrial diseases. Novel approaches such as those involving cytoplasm fusion and mitochondrial microinjection are essential for gene therapy of diseases caused by these mutations, due to the non-Mendelian genetics of these diseases.

**Key words** mitochondria; mitochondrial DNA; cellular model; cytoplasmic hybrid

Received: June 27, 2005 Accepted: August 11, 2005

This work was supported by the Science and Technology Committee of Beijing

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-83911316, E-mail: wangju53@263.net