

MFRN1过表达对293T细胞生长及线粒体功能的影响

杨宇¹ 陈琳¹ 张小勤¹ 张柳¹ 章万林¹ 施孟如^{1,2,3} 吕建新^{1,2,3*} 李伟^{1,2,3*}

¹浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ²检验医学教育部重点实验室, 温州 325035;

³温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

摘要 Mitoferrin-1(MFRN1)是溶质携带蛋白家族的一员, 是线粒体内膜上最主要的铁运输蛋白。为了观察MFRN1过表达对293T细胞生长及线粒体功能的影响, 采用包装慢病毒和感染293T细胞的方法构建MFRN1稳定过表达的细胞模型(293T-MFRN1), 并对其线粒体功能进行评价。构建的稳定细胞株293T-MFRN1中MFRN1转录水平及蛋白表达水平显著增加($P<0.01$), MFRN1过表达细胞线粒体内总铁的含量明显增加($P<0.05$); 电镜显示线粒体结构损伤, 线粒体嵴减少、空泡化; 线粒体能量代谢受抑制, 细胞ATP含量显著下降, 腺苷酸池总量(ATP+ADP+AMP)比对照组减少约40%; 细胞生长受到抑制, 在细胞培养48 h后高表达组细胞数量显著低于对照组; 细胞内羟自由基($\cdot\text{OH}$)含量增加; 线粒体DNA发生明显的氧化损伤。以上表明, MFRN1表达量的稳定对细胞功能极为重要, 表达量异常增加将导致细胞线粒体功能障碍、细胞增殖抑制。

关键词 MFRN1; 稳定转染; 线粒体功能; 活性氧; 能量代谢

Overexpression of MFRN1 in 293T Cell and Its Effects on the Cell Proliferation and Mitochondrial Function

Yang Yu¹, Chen Lin¹, Zhang Xiaoqin¹, Zhang Liu¹, Zhang Wanlin¹, Shi Mengru^{1,2,3}, Lü Jianxin^{1,2,3*}, Li Wei^{1,2,3*}

¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China;

²Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, Wenzhou 325035, China;

³School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Mitoferrin-1 (MFRN1) is a member of the solute carrier family as an essential iron importer, which is located in the mitochondrial inner membrane. In order to investigate the effect of MFRN1 overexpression in 293T cell line on cell proliferation and mitochondrial function, a MFRN1 stably overexpressed cell line was generated by lentiviral-mediated MFRN1 transfected into 293T cell line, then the mitochondrial function was measured. It was found that the level of MFRN1 expression was significantly increased in the MFRN1 stably overexpressed 293T cell line ($P<0.01$). Furthermore, it was observed that the total iron loading was markedly elevated in the overexpressed cell line ($P<0.05$). In addition, it was also found that the mitochondrial structure was damaged with mitochondrial cristae reduced and vacuolated, as well as energy metabolism in mitochondrion was inhibited. It was indicated that the cellular ATP content markedly decreased and total adenine nucleotide pool reduced by 40% compared to controls. Even-

收稿日期: 2014-05-12 接受日期: 2015-03-02

国家自然科学基金(批准号: 30900811)、浙江省自然科学基金(批准号: Y2090753)、教育部科技重点项目(批准号: 210084)和浙江省科技厅公益技术研究项目(批准号: 2011C37090)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: 0577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

Received: May 12, 2014 Accepted: March 2, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30900811), Zhejiang Natural Science Foundation (Grant No.Y2090753), Key Project of Science and Technology, Ministry of Education of China (Grant No.210084) and Public Technology Project of Science Technology Department of Zhejiang Province (Grant No.2011C37090)

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: +86-577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-03 16:49 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150603.1649.005.html>

tually, it was showed that the proliferation of overexpressed cell line were inhibited with significant reduction of cell counts, whereas the content of cellular hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) increased and oxidative damage of mitochondrial DNA occurred. It was concluded that MFRN1 played important roles in the cellular function, and the aberrant expression of MFRN1 could result in the mitochondrial dysfunction and inhibition of cell proliferation.

Keywords MFRN1; stable transfection; mitochondrial function; reactive oxygen species; energy metabolism

MFRN是一种定位在线粒体内膜上的胞质转运蛋白, 包括MFRN1和MFRN2两种同系物^[1], 其中MFRN1主要参与红系细胞线粒体内血红素和铁硫簇形成过程中铁的输入, 在红系细胞成熟过程中发挥着关键的作用^[2-4]。而MFRN2的表达具有普遍性, 在多种组织中均有不同水平的表达, 其具体的生物学功能尚不明确^[5]。线粒体是铁代谢的核心细胞器, 细胞内的铁85%以上是在线粒体内利用的^[6], 因此线粒体在铁的稳态中发挥着至关重要的作用。铁在细胞生命过程中扮演着双重角色。一方面, 铁参与到细胞内绝大多数的生物反应过程中, 在生物体内发挥着重要的作用; 另一方面, 铁又参与到活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生过程中^[7], 而活性氧已经被证明参与了细胞的疾病和衰老, 例如铁过盛则会导致铁离子增加进而形成氧化应激, 造成氧化损伤以及其他相关的疾病, 如阿尔茨海默病、弗里德里希共济失调症等严重的损伤^[8]。因此, 正常情况下细胞内铁的水平是受到严密监控的^[9-10]。机体对铁的吸收、转运、储存的精密调控机制既保证了铁能发挥其生物学作用, 又将其有害作用降低到最低水平^[11-12]。已有实验结果表明, MFRN1表达水平降低时会引起低色素性贫血、幼红细胞成熟滞后、原卟啉症等^[8-9]。表达水平增高可能使线粒体内的铁持续增加, 导致线粒体内的铁过载, 游离铁超过正常水平而引起细胞损伤, 例如线粒体结构损伤、ROS产生增加等。本实验拟通过在293T细胞中过表达MFRN1, 观察其对细胞生长和线粒体功能的影响, 以进一步阐明MFRN1在细胞中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中使用的HEK293T细胞株为本实验室保存, 293T17细胞株为顾海华教授实验室赠予, 细胞传代次数均在12~15代之间, 细胞状态良好; Stbl3菌株为本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司, 慢病毒包装试剂盒购自美国Genecopoeia公司、抗MFRN1抗体购自Sigma公司、Mitotracker Deep Red Probe及CellROX[®] oxidative stress reagents均购自Life Technology公司, $\cdot\text{OH}$ 检测试剂Hydroxyphenyl fluorescein购自Cell Technology公司, 胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限公司。

细胞培养皿(美国Corning公司), 倒置相差显微镜(日本Nikon公司), 荧光显微镜、激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司)、荧光定量PCR仪(美国Bio-rad公司)、流式细胞仪及凝胶成像系统(美国BD公司)、高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.3 细胞培养

293T细胞及293T17细胞培养基为含有10% FBS和1%双抗(青霉素、链霉素)的DMEM高糖培养基, 培养条件为37 °C、5% CO₂、饱和湿度无菌培养箱。

1.4 慢病毒包装

转染前2 d, 将293T17细胞接种到10 cm细胞培养皿中, 加入10 mL含有10%热灭活FBS的完全培养基, 于37 °C细胞培养箱中培养, 保证至转染时细胞融合度达到85%左右。转染开始前准备一只无菌聚丙烯管, 取表达质粒2.5 μg 、lenti-pac HIV mix 5.0 μL (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 加到200 μL Opti-MEM中; 另取一只无菌聚丙烯管, 稀释15 μL Endofectin到200 μL Opti-MEM中; 取稀释后的Endofectin Lenti reagent逐滴加到DNA溶液中(不可颠倒添加顺序), 轻微涡旋含DNA的管子, 室温孵育混合物25 min, 以形成DNA-Endofectin聚合物; 将混合物逐滴加入培养皿中, 同时轻摇培养皿使混合物分散均匀, 放回培养箱培养过夜; 12 h后用含有5%热灭活FBS的培养基换液, 同时加入2 μL 的Titerboost reagent(用于增加病毒滴度), 继续培养36 h。收集细胞培养液, 离心、过滤获得重组慢病毒颗粒, 一部分直接用于感染293T细胞, 测定病毒滴度, 其余的分装后冻存于-80 °C保存, 用于感染目的细胞。

1.5 慢病毒感染目的细胞构建稳定细胞株

根据慢病毒滴度测定结果确定最佳感染滴度(multiplicity of infection, MOI)值,并根据结果确定感染293T细胞所需使用的病毒量。12孔板接种细胞,用500 μL 含5%灭活FBS的培养基培养过夜,融合度达到60%左右时加入稀释的重组慢病毒感染细胞,添加聚凝胺(聚凝胺终浓度为7 $\mu\text{g}/\text{mL}$),同时设置未加入病毒的细胞作为对照组,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h后转移到培养箱中培养过夜,24 h后按1:3比例传代,加入不含聚凝胺的新鲜培养基。继续培养24 h后加嘌呤霉素筛选稳定转染株,用新鲜含有1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基更换陈旧培养基,2 d换液一次并维持药物浓度,直到抗药株很明显,此时对照组细胞应已全部杀死。这个过程大概维持1周,此时阳性克隆细胞呈团生长,将细胞克隆株消化后转移到新的孔中扩大培养,即获得稳定转染细胞。

1.6 荧光定量PCR

Trizol[®] reagent(Invitrogen)裂解细胞,酚:氯仿按照1:1的比例抽提RNA,随后用50%的异丙醇沉淀并用乙醇洗涤沉淀,最后用DEPC水溶解得到总RNA,用于荧光定量PCR。PCR引物为: F: 5'-GAG ATG ATG TGG GAC TGC G-3', R: 5'-CTA CCG GAG CTA CAC CAC G-3'。采用相对定量的方法测定目的基因的表达水平,以管家基因 β -actin作为内参,引物序列为: F: 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3', R: 5'-TCG GTG AGG ATC TTC ATG AGG TA-3'。

1.7 Western blot分析

用RIPA裂解液(碧云天)裂解293T细胞,提取蛋白。测浓度后将40 μg 蛋白溶解在Laemmli缓冲液中,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性后通过SDS/PAGE凝胶(12%凝胶)电泳分离蛋白质。将蛋白质转到PVDF膜上,分别用抗MFRN1抗体(1:400)(Sigma)及抗 β -actin抗体(1:1 000)(碧云天)通过免疫印迹实验显色。

1.8 线粒体总铁含量检测

使用原子吸收法检测线粒体裂解物中的总铁含量,根据蛋白浓度测定结果对数据进行校准,结果以单位质量的蛋白中含有的铁总量表示。首先,分离线粒体参照文献[13]的蔗糖密度梯度离心法,并对该方法进行了改进。加入500 μL “WB及IP细胞裂解液”,吹打混匀后置于冰上裂解45 min,然后4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min,取上清用于检测裂解产物内的总铁含量;原子吸收仪检测参数设定:石墨炉法

检测,检测波长为386 nm,特征浓度为6.0 $\mu\text{g}/\text{L}$,设置0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 五个浓度梯度制作标准曲线,采用新合理拟合方程计算铁的含量,实验独立重复三次以上,最后进行统计学分析。

1.9 线粒体顺乌头酸酶活性检测

以柠檬酸三钠为底物,偶联异柠檬酸脱氢酶(NADP⁺)反应,通过测定340 nm处吸光度的变化反映NADPH增加量,进而反映线粒体顺乌头酸酶(aconitase, ACO2)的活性。酶的活性大小定义为:每毫克蛋白每分钟增加的吸光度。具体操作如下:将分离的线粒体用线粒体裂解液(碧云天)于冰上裂解30 min,15 000 r/min离心5 min,获得上清即为含有ACO2的线粒体裂解产物。96孔板中加入配好的酶反应底物200 μL ,再加入10 μL 含酶上清,混合均匀后25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min,最后加入异柠檬酸脱氢酶启动反应,于340 nm处检测吸光度。酶标仪设置为37 $^{\circ}\text{C}$,每分钟检测一次,共检测20 min。

1.10 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测细胞内腺苷酸

用胰酶消化细胞,收集到1.5 mL EP管中,离心去除上清,加入200 μL 高氯酸于冰上处理细胞45 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心取上清,经过0.22 μm 微孔滤膜过滤后通过HPLC检测ATP、ADP、AMP含量。

1.11 电镜观察线粒体形态改变

胰酶消化后收集细胞,离心后PBS洗涤细胞一次,FBS重悬细胞后加入戊二醛于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。磷酸盐缓冲液洗涤细胞,随后用1%锇酸固定细胞1 h,缓冲液洗脱残余锇酸后通过酒精梯度脱水,纯丙酮深度脱水一次,20 min;包埋液/丙酮=1:1混合后处理细胞1 h,然后包埋液/丙酮=3:1处理细胞3 h,包埋剂包埋细胞过夜;第二天将包埋过夜的样本取出再加入纯的包埋液70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温过夜。准备好标签,标记好细胞名称、编号。取出样品转移到另一新的0.5 mL离心管中,加入纯包埋液同时将标签纸贴壁放入离心管中,烘箱中干燥。干燥后制作半薄切片和超薄切片,用于透射电镜观察线粒体形态变化。

1.12 CCK-8(Cell Counting Kit-8)检测细胞增殖情况

取对数生长的293T、293T-NEG、293T-MFRN1细胞接种到96孔板中,每孔接种2 000个细胞,加入含有10% FBS的完全培养基,培养过夜。每种细胞设置

6个复孔,并同时铺4块96孔板,分别在0, 24, 72, 96 h时移去培养基,加入100 μL 含有10 μL CCK-8的完全培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养6 h,检测各个孔在450 nm处的吸光度,作为“0”h时细胞数。所有实验重复三次(注:0 h选择的时间为接种细胞后6 h,因为此时细胞刚完成贴壁尚未开始分裂,检测的为活细胞数的基础值,用于后期数据的校准)。

1.13 长片段PCR法检测线粒体DNA氧化损伤

采用长片段PCR方法检测线粒体DNA的氧化损伤。实验原理:线粒体DNA氧化损伤发生最典型的是形成8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-OHdG)。8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(human 8 hydroxyguanine glycosylase, hOGG1)可以识别并切割8-OHdG位点,使DNA断裂,可以作为模板的DNA链减少,因此,同样条件及循环次数下,发生氧化损伤越明显的样品其扩增产物量与ddH₂O处理的对照组差别越大。方法:提取细胞总DNA,经HOGG1酶切处理,同时设置ddH₂O处理组作为对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min酶切线粒体DNA,然后转移到65 $^{\circ}\text{C}$ 保持15 min,使酶灭活。酶切产物置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。针对线粒体DNA设计引物进行长片段扩增,使用的引物序列为:F: 5'-TGA GGC CAA ATA TCA TTC TGA GGG GC-3', R: 5'-TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG-3',扩增产物大小为16.2 Kb。PCR产物经0.5%琼脂糖凝胶电泳分析,用酶处理组与ddH₂O处理组条带亮度的差异反应线粒体DNA的氧化损伤程度,差异越明显说

明线粒体DNA氧化损伤程度越深。

1.14 细胞总ROS水平检测

于24孔板中接种细胞,密度保证第二天融合度达到80%左右。检测前陈旧培养基更换为新鲜的含有5 $\mu\text{mol/L}$ CellROX[®] oxidative stress reagents(Life Technologies)的完全培养基,在37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养30 min,然后弃去培养基用PBS洗涤细胞5 min \times 3次,去除残留的染料;胰酶消化细胞1 min后弃去,用FBS终止消化,吹打成单细胞悬液,将细胞收集到1.5 mL EP管中,离心去除FBS,再加入300 μL PBS重悬细胞,上机检测。检测结果用荧光强度表示,整个操作过程中应注意避免较强的光线直接照射细胞。

1.15 细胞内羟自由基检测

用改良Hank's平衡盐溶液(HBSS)冲洗细胞,加入用HBSS稀释成终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的Hydroxyphenyl Fluorescein(HPF),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育细胞30 min,直接在荧光显微镜下观察(HPF激发波长488 nm,发射波长515 nm)。

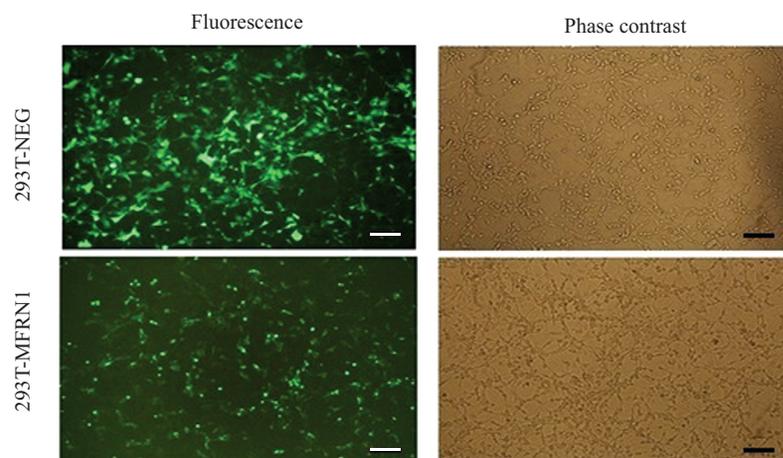
1.16 数据统计

实验数据以mean \pm S.D.形式表示,用GraphPad Prism 5软件进行独立样本 t 检验,分析显著性差异。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 构建的稳定细胞株

获得的稳定细胞株293T-MFRN1荧光亮度较弱,



Fluorescence: 蓝色激发光下观察稳定转染细胞绿色荧光; Phase contrast: 相同视野的白光对照。293T-NEG: 对照载体细胞株; 293T-MFRN1: MFRN1过表达细胞株。标尺=5 μm 。

Fluorescence: observation of stable transfected cell line under blue light; Phase contrast: observation of the same field under white light. 293T-NEG: negative control cell lines; 293T-MFRN1: MFRN1 overexpressed cells. Scale bars=5 μm .

图1 慢病毒介导的MFRN1稳定转染细胞株的建立

Fig.1 Establishment of lentiviral mediated MFRN1 stably overexpressed cell lines

空载对照细胞荧光很强, 可能是因为MFRN1与egfp基因融合后增加了egfp基因表达负荷, 使荧光强度减弱, 荧光显微镜下拍照结果如图1所示。

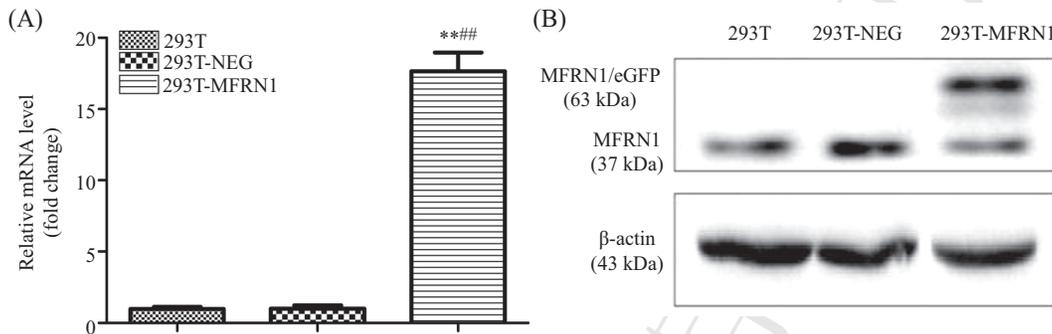
2.2 稳定细胞株的鉴定

与空白对照组及空载体对照组相比, 过表达组

细胞MFRN1转录水平升高约16倍($P < 0.01$)(图2A), 且过表达组细胞MFRN1蛋白表达水平显著增加(图2B)。

2.3 稳定细胞株线粒体内总铁含量的检测

通过直接法(检测细胞线粒体内总铁含量, 详见

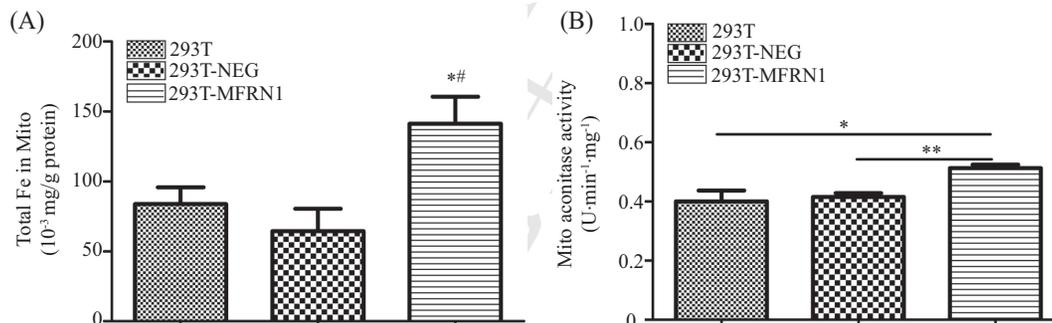


A: qRT-PCR检测MFRN1表达, **/## $P < 0.01$, 分别与293T和293T-NEG组比较; B: Western blot检测MFRN1蛋白表达。

A: expression of MFRN1 detected by qRT-PCR, **/## $P < 0.01$ compared to 293T and 293T-NEG, respectively; B: expression of MFRN1 tested by Western blot.

图2 MFRN1在稳定转染细胞株中的表达

Fig.2 Expression of MFRN1 in stably transfected cell lines



A: 原子吸收仪检测293T-MFRN1细胞中线粒体内铁含量, */# $P < 0.05$, 分别与293T和293T-NEG组比较; B: 293T-MFRN1细胞中线粒体ACO2酶活性检测(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

A: mitochondrial iron loading in 293T-MFRN1 cell lines detected by atomic absorption spectroscopy, */# $P < 0.05$ compared to 293T and 293T-NEG, respectively; B: measurement of mitochondrial aconitase activity in 293T-MFRN1 cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

图3 293T-MFRN1细胞中线粒体内铁含量检测

Fig.3 Measurement of mitochondrial iron loading in 293T-MFRN1 cell lines

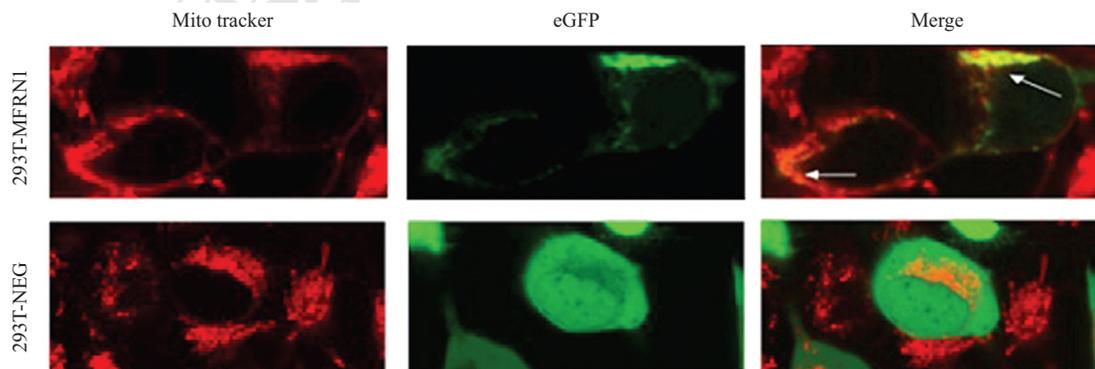
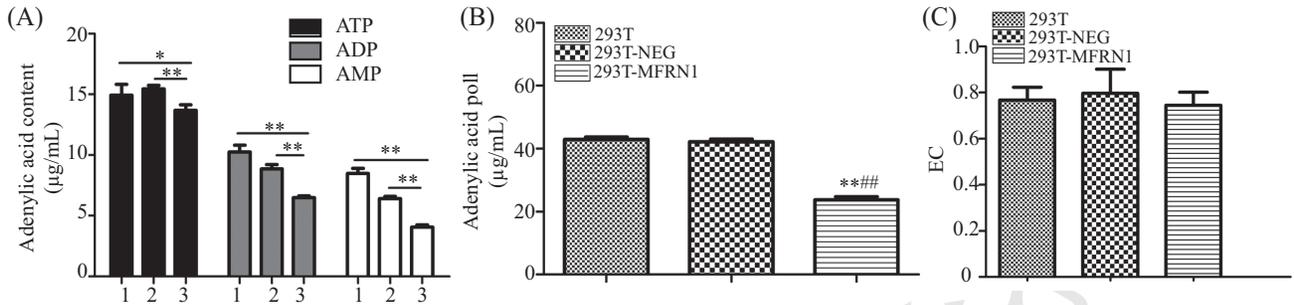


图4 融合蛋白MFRN1/eGFP定位到线粒体上(600×)

Fig.4 Fusion protein MFRN1/eGFP was localized to mitochondria (600×)



A: 高效液相色谱(HPLC)法检测稳转细胞株ATP、ADP及AMP含量(1: 293T; 2: 293T-NEG; 3: 293T-MFRN1), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B: 腺苷酸池总量, **/### $P < 0.01$, 分别与293T和293T-NEG组比较; C: 能荷计算结果。

A: contents of ATP, ADP and AMP detected by HPLC (1: 293T; 2: 293T-NEG; 3: 293T-MFRN1), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B: total adenine nucleotide pool, **/### $P < 0.01$ compared to 293T and 293T-NEG, respectively; C: calculation of energy charge.

图5 高效液相色谱法检测ATP、ADP和AMP含量

Fig.5 Detection of the contents of ATP, ADP and AMP by HPLC

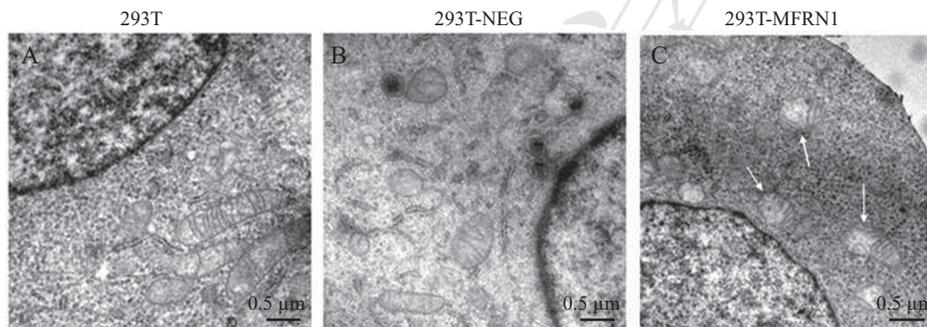
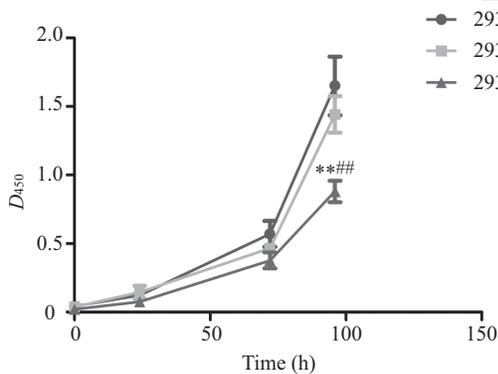


图6 293T-MFRN1细胞线粒体超微结构电镜观察

Fig.6 Investigation of mitochondrial ultrastructure by electron microscope



**/### $P < 0.01$, 分别与293T和293T-NEG组比较。

**/### $P < 0.01$ compared to 293T and 293T-NEG, respectively.

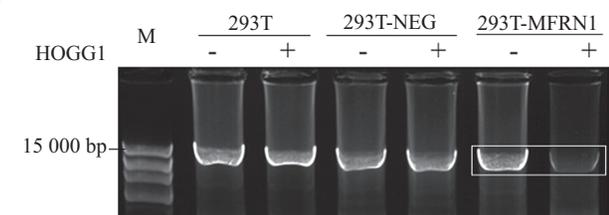
图7 293T-MFRN1细胞增殖速度测定

Fig.7 Measurement of the cell proliferation of 293T-MFRN1 cell lines

1.8)和间接方法(检测线粒体顺乌头酸酶活性, 详见1.9)分别检测线粒体内铁含量, 发现MFRN1稳定过表达细胞株线粒体内铁含量增加, 与对照组相比具有显著统计学意义(图3)($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.4 蛋白质MFRN1/eGFP在细胞内的定位

通过eGFP与线粒体染色共定位检测外源表达的



“-”: ddH₂O处理DNA模板; “+”: HOGG1处理DNA模板; M: marker。

“-”: template DNA treated with ddH₂O; “+”: template DNA treated with HOGG1; M: marker.

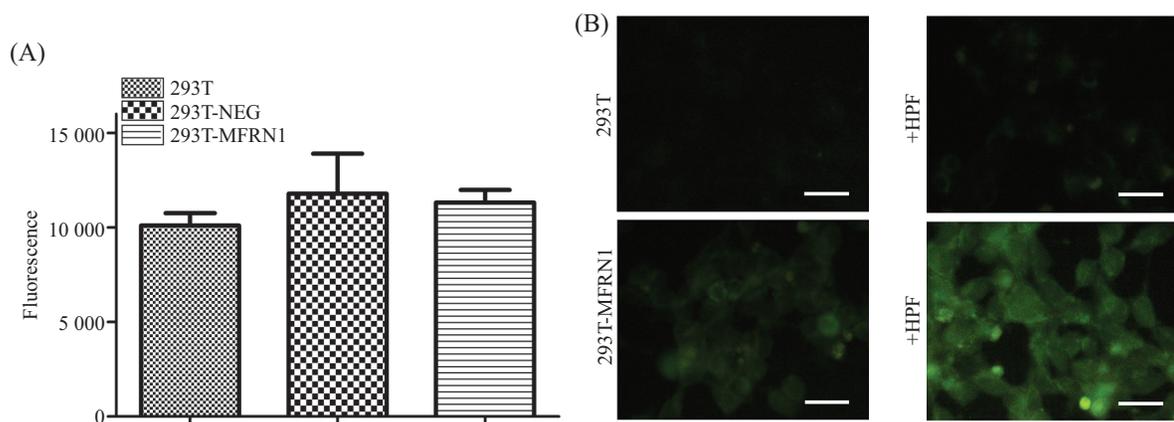
图8 线粒体DNA氧化损伤的检测

Fig.8 Detection of oxidative damaged mitochondrial DNA

蛋白质是否定位到线粒体。结果如图4所示, 对照组eGFP蛋白分布在整个细胞中, 293T-MFRN1细胞外源表达的融合蛋白定位到了线粒体上(图4白色箭头所示)。

2.5 细胞ATP、ADP和AMP水平检测

分析发现, 与对照组相比较, 高表达组细胞内ATP、ADP、AMP及腺苷酸池总量(ATP+ADP+AMP)均明显降低(图5)($P < 0.01$), 提示高表达组细胞线粒体能量代谢受抑制, 细胞内的能量物质减少。



A: 流式细胞仪定量检测细胞内总活性氧含量; B: 羟苯基荧光素检测细胞内羟自由基含量。荧光显微镜下选择蓝紫色激发光分别观察实验组(293T-MFRN1)和对照组(293T)细胞用HPF染色剂染色前后细胞荧光。左侧为加染料前,右侧为加染料后。标尺=0.2 μm 。

A: total ROS in 293T-MFRN1 cell lines was detected by flow cytometry; B: cellular hydroxyl free radical measured by hydroxyphenyl fluorescein (HPF). Observation of the fluorescence of 293T and 293T-MFRN1 before and after dyeing by HPF under blue light. The left was control, while the right added HPF. Scale bars=0.2 μm .

图9 293T细胞总活性氧及·OH含量检测

Fig.9 Measurement of total ROS and ·OH levels in 293T-MFRN1 cell lines

2.6 线粒体结构的电镜观察

293T-MFRN1细胞线粒体嵴损伤,数量减少、线粒体空泡化改变明显(图6C白色箭头所示)。

2.7 CCK-8实验检测细胞的增殖

高表达组细胞在实验开始48 h后生长减慢,增殖速度与空白对照组和空载体对照组相比均显著降低(图7)($P < 0.01$),空载对照组与阴性对照组之间没有明显差异,提示293T细胞中过表达MFRN1可导致细胞增殖受到抑制。

2.8 mtDNA氧化损伤及细胞活性氧水平检测结果

长片段PCR检测结果显示,高表达组酶切处理比ddH₂O处理样品条带弱(图8),说明高表达组细胞线粒体DNA氧化损伤程度比对照组明显增加;293T-MFRN1细胞内的总ROS水平没有明显的改变(图9A, $P > 0.05$),但是其中的羟自由基含量增加(图9B)。

3 讨论

MFRN1是定位在线粒体内膜上的转运蛋白,是细胞质内的铁进入线粒体过程中最主要的转运体^[14-16]。铁是生命所必需的元素,而过多游离的铁又具有细胞毒性,因此,正常情况下细胞内铁的水平是受到严密调控的^[3,5-6]。线粒体是能量转换的核心细胞器,同时也是细胞内铁代谢的中心场所^[17],线粒体内铁代谢通路的紊乱会严重影响整个细胞的铁平衡以及能量代谢。本实验中构建了稳定过表达MFRN1的细

胞株(图1),经鉴定,稳定株MFRN1表达水平明显增加(图2)。而且过表达的融合蛋白定位于线粒体上(图4)。原子吸收仪检测结果表明,高表达组细胞线粒体内铁的含量比对照组显著增加($P < 0.05$)。ACO2活性大小可反映线粒体内铁的含量。实验中检测了293T-MFRN1细胞中ACO2的活性,发现ACO2活性增加($P < 0.05$),间接证明线粒体内铁含量增加。说明在293T细胞中过表达MFRN1能够将胞质中的铁转运到线粒体内,引起线粒体铁过载。

线粒体结构的完整性是其发挥正常功能的必要条件^[18]。有文献报道,高铁负荷处理离体的线粒体可以引起线粒体肿胀,并造成线粒体结构受损^[19]。为了检测活细胞内的线粒体处于高铁负荷时是否会引起同样的结果,我们通过电镜观察了293T-MFRN1细胞的线粒体结构。结果表明,高表达组细胞线粒体嵴受到破坏、数量减少、普遍空泡化改变,说明活体细胞内的线粒体在铁过载时也会引起结构损伤。线粒体嵴是氧化磷酸化发生的重要场所,因此,线粒体嵴损伤将进一步引起线粒体能量代谢障碍^[18-19]。HPLC检测结果显示,高表达组细胞ATP含量明显降低,腺苷酸池总量降低(图5),但是细胞能荷($EC = [\text{ATP} + 1/2\text{ADP}] / [\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}]$)没有明显变化。能荷的稳定对于细胞维持能量转换是必需的,其高低主要反应细胞ATP-ADP-AMP系统的能量状态。能荷高可促进

ATP合成而抑制其分解,相反,能荷低则促进分解而抑制合成。我们实验中也发现,293T-MFRN1细胞中ATP含量减少,但是减少的程度不如ADP/AMP明显,这可能是细胞为了维持能荷的稳定而代偿性地减少了部分ADP/AMP所致。

细胞的增殖需要能量的供应。线粒体是最重要的产能细胞器,其结构受损将导致细胞能量供应不足。我们通过CCK-8测定293T细胞的增殖发现,293T-MFRN1细胞与对照组相比生长速度明显变慢,细胞增殖受到抑制。我们推测,由于高表达组细胞线粒体结构受损,产能不足引起了生长障碍,其确切的作用机制还需要进一步研究。

线粒体DNA缺乏组蛋白的保护,与氧化磷酸化场所(线粒体内膜)距离较近,且缺乏核DNA的自我修复机制^[20],因此较易因氧化损伤而引起突变,其突变率是核DNA的10倍^[21]。线粒体DNA氧化损伤最主要的是形成8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG),通过长片段PCR检测8-OHdG含量发现,293T-MFRN1细胞线粒体DNA氧化损伤程度明显增加,提示铁在线粒体内的堆积引起了mtDNA的氧化损伤。活性氧是线粒体DNA氧化损伤发生的最主要原因^[22]。使用CellROX[®] oxidative stress reagents检测细胞内总活性氧的水平,发现与对照组相比较没有明显改变($P>0.05$)。羟自由基($\cdot\text{OH}$)是反应活性最强的一种活性氧^[23],但其含量极低,半衰期短,常规方法难以检测。我们使用Hydroxyphenyl fluorescein(HPF)针对性检测 $\cdot\text{OH}$ 含量,发现高表达组细胞内 $\cdot\text{OH}$ 含量显著增加(图9B)。我们推测,过多的铁进入线粒体后产生大量的亚铁离子(Fe^{2+}), Fe^{2+} 与靠近线粒体膜的DNA短暂结合,构成Fenton反应的核心,此时 Fe^{2+} 催化 H_2O_2 产生大量高活性的 $\cdot\text{OH}$,并在原位氧化损伤线粒体DNA,也说明线粒体内铁的增加主要是通过诱导产生大量的 $\cdot\text{OH}$ 引起线粒体DNA损伤,而其他类型的活性氧没有发生明显改变。

综上所述,本实验的研究结果显示,在真核细胞293T中过表达MFRN1引起线粒体内铁过载,过多的铁堆积导致羟自由基增加,进而造成线粒体DNA氧化损伤及线粒体功能障碍和细胞生长抑制。

参考文献 (References)

- 1 Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, *et al.* Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 2006; 440(7080): 96-100.
- 2 Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, *et al.* Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(38): 16263-8.
- 3 Metzendorf C, Wu W, Lind MI. Overexpression of *Drosophila* mitoferrin 1(2)mbn cells results in dysregulation of Fer1HCH expression. *Biochem J* 2009; 421(3): 463-71.
- 4 Chung J, Anderson SA, Gwynn B, Deck KM, Chen MJ, Langer NB, *et al.* Iron regulatory protein-1 protects against mitoferrin-1-deficient porphyria. *J Biol Chem* 2014; 289(11): 7835-43.
- 5 Paradkar PN, Zumbrennen KB. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and Mitoferrin 2. *Mol Cell Biol* 2009; 29(4): 1007-16.
- 6 Hadzhieva M, Kirches CE. Mawrin. Review: Iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40(3): 240-57.
- 7 Castellani RJ, Moreira PI, Liu G, Dobson J, Perry G, Smith MA, *et al.* Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem Res* 2007; 32(10): 1640-5.
- 8 Hadzhieva M, Kirches E, Wilisch-Neuman A, Pachow D, Wallesch M, Schonefeld P, *et al.* dysregulation of iron protein expression in the G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 2013; 230: 94-101.
- 9 Yamamoto M, Arimura H, Fukushige T, Minami K, Nishizawa Y, Tanimoto A, *et al.* Abcb10 role in heme biosynthesis *in vivo*: Abcb10 knockout in mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation. *Mol Cell Biol* 2014; 34(6): 1077-84.
- 10 Metzendorf C, Lind MI. *Drosophila* mitoferrin is essential for male fertility: Evidence for a role of mitochondrial iron metabolism during spermatogenesis. *BMC Dev Biol* 2010; 10(1): 1-17.
- 11 Hales KG. Iron testes sperm mitochondria as a context for dissecting iron metabolism. *BMC Biol* 2010; 8(79): 1-3.
- 12 Sheftel A, Stehling R, Lill O. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(5): 302-14.
- 13 Sims NR, Anderson MF. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* 2008; 3(7): 1228-39.
- 14 Froschauer EM, Schweyen RJ, Wiesenberger G. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3Mrs4mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(5): 1044-50.
- 15 Amigo JD. Identification of distal cis-regulatory elements at mouse mitoferrin loci using zebrafish transgenesis. *Mol Cell Biol* 2011; 31(7): 1344-56.
- 16 Ren Yaguang, Yang Su, Tan Guoqiang, Ye W, Liu D, Qian X, *et al.* Reduction of mitoferrin results in abnormal development and extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2012; 7(1): 1-9.
- 17 Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, Suryo Rahmanto Y, *et al.* Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(24): 10775-82.
- 18 Carley AN, Taegtmeyer ED, Lewandowski H. Matrix revisited: Mechanisms linking energy substrate metabolism to the function of the heart. *Circ Res* 2014; 114(4): 717-29.
- 19 Galli GL, Richards JG. Mitochondria from anoxia-tolerant

- animals reveal common strategies to survive without oxygen. *J Comp Physiol B* 2014; 184(3): 285-302.
- 20 Bandy BA, Davison J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: Implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 1990; 8(6): 523-39.
- 21 Sollner T, Schmidt C, Schmelzer C. Amplification of the yeast nuclear gene MRS3 confers suppression of a mitochondrial RNA splice defect. *Curr Genet* 1987; 12(7): 497-501.
- 22 Song MF, Li YS, Kasai H, Kawai K. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *J Clin Biochem Nutr* 2012; 50(3): 211-6.
- 23 Mesarosova M, Kozics K, Babelova A, Regendova E, Pastorek M, Vnukova D, *et al.* The role of reactive oxygen species in the genotoxicity of surface-modified magnetite nanoparticles. *Toxicol Lett* 2014; 226(3): 303-13.

中国细胞生物学