

线粒体DNA拷贝量降低诱发人支气管上皮细胞钙信号失调

尉红¹ 薛莲² 李冰燕¹ 童建¹ 张增利^{1*}

(¹苏州大学卫生毒理学教研室, 苏州 215123; ²苏州大学职业与环境卫生教研室, 苏州 215123)

摘要 采用溴化乙锭(EtBr)诱导线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝量降低的人支气管上皮细胞株(ρ^- HBE); Real-time PCR与共聚焦成像表明, 经EtBr诱导60 d并挑取的单克隆细胞株, 其mtDNA拷贝量下降为正常细胞的24%, 成功构建了 ρ^- HBE。与母本细胞相比, ρ^- HBE群体倍增时间延长, 生长速度减慢。流式细胞术检测细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)下降, 以Fura-2标记胞浆内游离钙, ρ^- HBE $[Ca^{2+}]_i$ 升高; 线粒体解耦联剂FCCP刺激细胞后, 激光共聚焦扫描显微镜动态监测单个活细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化, 发现 $[Ca^{2+}]_i$ 水平波动幅度小。提示mtDNA拷贝数降低可导致细胞内钙信号调节紊乱。

关键词 线粒体DNA; 拷贝数; 线粒体膜电位; 钙离子

统计学数据显示, 16岁到65岁的男性与16岁到60岁的女性中, 9.2/100 000患有临床线粒体性疾病, 另外尚有16.5/100 000的儿童和成年人易患线粒体性疾病^[1]。作为细胞代谢网络和信号传导网络的重要调控细胞器, 线粒体在生长、发育、代谢、衰老、疾病、死亡等多个方面表现出重要作用。大量的流行病学资料表明, 线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变或拷贝数异常与多个系统、多种疾病的发生密切相关^[2], 如线粒体脑肌病、Léger遗传性视神经病、神经退行性疾病、肿瘤^[3]、心肌病^[4]、糖尿病、先天性失明等。因此, 线粒体DNA缺失细胞系为研究mtDNA与核基因组(nDNA)的相互作用以及mtDNA突变的分子致病机制等方面提供了条件。溴化乙锭(ethidium bromide, EtBr)通过插入无核蛋白保护的DNA分子层状排列的碱基对之间, 从而与mtDNA的双链牢固结合抑制mtDNA的复制和转录^[5], 而不影响nDNA的复制和转录^[6], 因此, EtBr诱导法成为应用构建mtDNA缺失细胞最多、最经典的方法。

线粒体是极为重要的钙调控器官, 线粒体介导的钙离子转运系统是整个细胞内钙信号转导的一部分。钙离子作为细胞内重要的第二信使, 参与调控许多细胞和组织的生理活动, 包括肌肉收缩、新陈代谢、分泌以及细胞分裂等, 钙离子调节紊乱与许许多多线粒体疾病相关^[7]。因此, 进一步研究mtDNA量减少是否通过影响钙离子平衡, 从而导致

线粒体疾病的发生及发展, 对于阐明线粒体疾病的发病机制、减缓线粒体疾病的进展及阻断继发损害具有重要意义, 本研究以人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell, HBE)为研究对象, 通过构建mtDNA拷贝数降低的细胞模型, 探讨mtDNA量减少对细胞内游离钙及钙离子动态变化的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系和实验试剂

HBE细胞由中山大学陈雯教授馈赠。溴化乙锭、丙酮酸钠、尿嘧啶为Sigma公司产品; 胎牛血清(FBS)为Hyclone公司产品; 高糖DMEM、胰酶为Gibco公司产品; 细胞全基因组提取试剂盒(QIAmp DNA Blood Mini Kit)为Qiagen公司产品; Power SYBR[®] Green PCR Master Mix为ABI公司产品; 荧光探针Fluo-3/AM、Fura-2/AM、JC-1、Pico-green为Molecular Probe公司产品; MitoTracker Red H₂CMXRos为Invitrogen公司产品。诱导培养基: EtBr, 100 μ g/mL丙酮酸钠, 50 μ g/mL尿嘧啶, 10% FBS, 1 \times DMEM。钙负载I液: 137 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1 mmol/L NaH₂PO₄, 0.56 mmol/L MgCl₂, 1.8 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, 用KOH调节pH至7.4。

收稿日期: 2012-02-28 接受日期: 2012-09-20

国家自然科学基金国际重大合作项目(No.81020108028)资助项目

*通讯作者。Tel: 0512-65880074, E-mail: zhangzengli@suda.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 mtDNA拷贝数减少(knock-down of mitochondrial DNA, ρ^-)HBE细胞株的构建 据预实验观察, HBE细胞在20, 50, 100 ng/mL EtBr培养基中的生长状况, 确定EtBr的应用浓度为20 ng/mL。将HBE细胞培养于含20 ng/mL EtBr的诱导培养基中, 连续培养60 d后, 采用有限稀释法挑取一个单克隆细胞株扩增培养。

1.2.2 Real-time PCR检测mtDNA拷贝数变化 细胞经胰酶消化, 离心收集细胞。参照试剂盒提供的操作说明, 提取 5×10^6 细胞全基因组DNA, 紫外分光光度计测定吸光度 D_{260} 、 D_{280} 值, 确定DNA纯度及含量。采用mtDNA编码的ND1扩增mtDNA, 以GAPDH做内参基因, 引物序列如表1。建立25 μ L反应体系, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法在7500 Real-time PCR仪(Applied Biosystem, 美国)检测DNA的相对表达量。Real-time PCR的循环参数: 预变性95 $^{\circ}$ C 10 min; 变性95 $^{\circ}$ C 15 s, 复性60 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每组设定6个复孔, 3个孔扩增nDNA, 3个孔扩增mtDNA。将对照组HBE细胞的ND1/GAPDH比值设定为1, 计算EtBr处理细胞的mtDNA相对拷贝数。

表1 ND1与GAPDH引物序列

Table 1 Primer sequences for amplification of mtDNA and nDNA

引物	引物序列
Primers	Primer sequences
ND1	Forward: 5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3'
	Reverse: 5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3'
GAPDH	Forward: 5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA-3'
	Reverse: 5'-AGA GTT GTC AGG GCC CTT TT-3'

1.2.3 共聚焦激光扫描显微镜观察mtDNA数目以及线粒体形态 将 5×10^4 细胞接种至玻璃皿底的35 mm培养皿中, 细胞贴壁后, PBS洗两遍, 严格避光条件下, 加入双链DNA敏感性的荧光探针Picogreen(终浓度为3 μ L/mL), 37 $^{\circ}$ C避光孵育45 min; 再加入线粒体形态的特异性标记物MitoTracker Red H₂C-MXRos(终浓度为200 nmol/mL), 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, DMEM培养基冲洗2遍, 共聚焦激光扫描显微镜(TCS-SP2, Leica公司, 德国)下观察。设定Picogreen激发波长为488 nm, 发射波长为520 nm, MitoTracker Red

H₂CMXRos激发波长543 nm, 发射波长599 nm。

1.2.4 细胞生长状态检测 将处于对数生长期的各组细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^3 /mL, 将2 mL细胞悬液接种至35 mm培养皿中, 每组细胞接种27个皿, 置于培养箱内培养。于细胞接种后的第1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 d采用台盼蓝染色, 血细胞记数板计数活细胞, 每组细胞每次取3皿, 计算均数, 绘制生长曲线, 计算群体倍增时间^[8]。

1.2.5 流式细胞术检测细胞内线粒体膜电位(mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$)、 $[Ca^{2+}]_i$ 将细胞接种至100 mm培养皿中, 细胞密度达70%时, 以0.25%胰蛋白酶+0.05% EDTA消化为单细胞悬液, 移入离心管中, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入1 mL PBS混匀, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入1 mL 染色液, JC-1、Fluo-3/AM终浓度均为10 μ mol/L。轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 离心弃上清, 加入PBS洗2次, 重悬于500 μ L PBS中, 进行流式细胞仪(FC500, BECKMAN公司, 美国)检测。JC-1检测 $\Delta\Psi_m$ 时, 激发波长488 nm, 应用前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)设门后, 通过荧光通道FL1(绿)和FL3(红)分别检测荧光强度(X -mean); Fluo-3/AM检测 $[Ca^{2+}]_i$ 时, 激发波长为488 nm, 发射波长为526 nm, 测定荧光强度, 数据以荧光强度表示, 它与细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的浓度成正比。每管计数10 000个细胞, 每组设定3个平行样。

1.2.6 活细胞工作站检测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化 将 5×10^4 细胞接种至玻璃皿底的35 mm培养皿, 细胞贴壁后, 钙负载I液洗两遍, 严格避光条件下, 向培养皿中加入终浓度为10 μ mol/L的Fura-2/AM, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 用钙负载I液冲洗3次, 加入钙负载I液, 将培养皿放在活细胞工作站(Olympus, 日本)37 $^{\circ}$ C恒温、5% CO₂的载物小室中。使用双激发单发射的方式进行扫描: 双激发波长分别为340 nm和380 nm, 发射波长为505 nm, 每1秒扫描一次, 共扫描240次; 首先测定静息状态下细胞内的荧光水平, 之后用微量进样针吸除钙负载I液, 立即加入FCCP(FCCP溶于钙负载I液中, FCCP终浓度为2 μ mol/L和12 μ mol/L), 实时观察细胞内荧光强度的变化。每组随机选定11个细胞作为分析细胞并计算平均荧光强度值, F340/F380比值被用来反应 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。

1.2.7 统计学分析 实验数据以均值 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示, 采用SPSS 17.0统计学软件进行t检

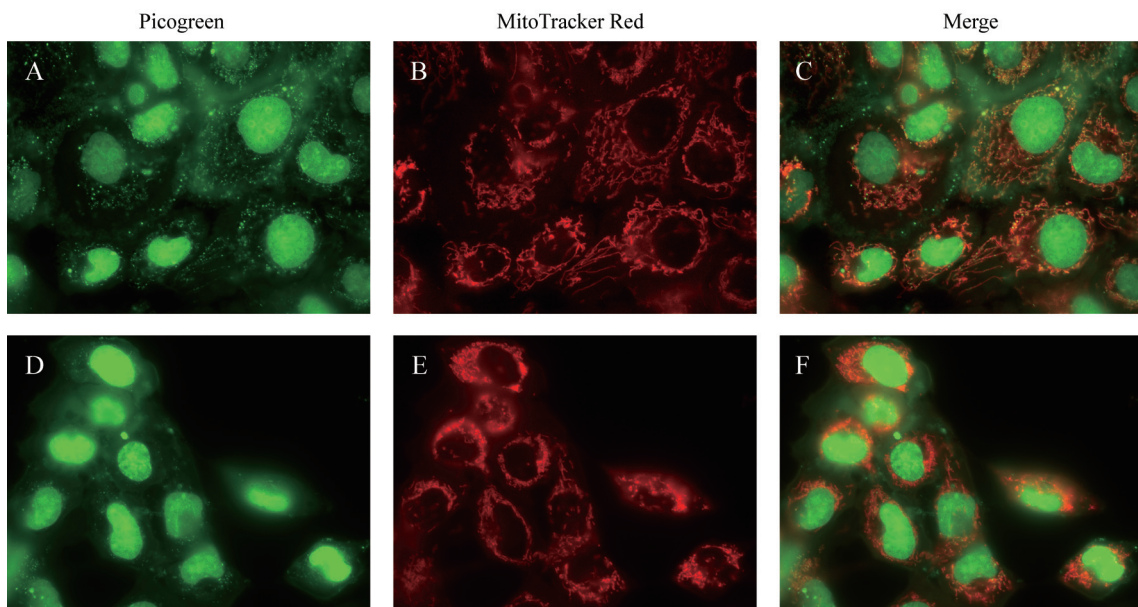
验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ρ^- HBE细胞株的构建与鉴定

HBE细胞在20 ng/mL EtBr的诱导培养基中连续培养60 d后,采用有限稀释法挑选单个克隆,扩增后使用Real-time PCR法检测其线粒体含量。实验结果发现,与对照组HBE细胞相比,其mtDNA含量降低了(76±4%)。为了与线粒体数目完全缺失的(knock out of mitochondrial DNA, ρ^0)细胞区别,我们把mtDNA含量减少76%的细胞定义为 ρ^- HBE,把正常对照细胞定义为 ρ^+ HBE。

图1的实验结果表明,使用双链DNA敏感性的荧光探针Picogreen标记后,对照组HBE细胞浆和细胞核内绿色荧光点多,并且明亮,通过计数10个细胞,其绿色荧光点数平均为(127±29) points/cell(图1A); ρ^- HBE细胞核上的绿色荧光强度与对照组细胞相比较没有明显变化,但是细胞浆内绿色荧光点数明显减少(图1D),说明20 ng/mL EtBr能成功构建线粒体拷贝数降低的HBE细胞株。同时,在线粒体特异性的标记物MitoTracker Red的染色图可以观察到,对照组HBE细胞线粒体为线状或细丝状、数量多、环绕分散在细胞内,而 ρ^- HBE细胞的线粒体呈短杆状或棒状、数量减少、多聚集在核周。



A-C: ρ^+ HBE; D-F: ρ^- HBE.

图1 ρ^- HBE细胞线粒体的形态和mtDNA含量的变化

Fig.1 Changes of mitochondrial morphology and mtDNA content in ρ^- HBE

2.2 ρ^- HBE细胞生长速率的变化

以培养时间为横坐标轴,培养不同天数的细胞数为纵坐标轴,绘制生长曲线(图2)。根据生长曲线,选取细胞处于对数生长期的时间相: ρ^+ HBE细胞为第9天至第13天, ρ^- HBE细胞为第9天至第15天。利用公式 $Td = 0.693t / \ln(N_t/N_0)$ 计算群体倍增时间,得到 ρ^+ HBE和 ρ^- HBE的群体倍增时间分别为(37.97±1.33) h和(48.64±0.79) h,说明mtDNA量减少的 ρ^- HBE细胞增殖速度慢于正常细胞(两者比较差异有统计学意义, $P < 0.01$)。

2.3 ρ^- HBE细胞内 $\Delta\Psi_m$ 和 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的变化

在线粒体膜电位正常时,JC-1形成聚合体产生红色荧光;在线粒体膜电位降低时,JC-1多表现为单体,产生绿色荧光。因此,使用红绿荧光强度的相对比值(FL3/FL1)可以评价线粒体膜电位。表2的实验结果显示,与 ρ^+ HBE相比较, ρ^- HBE细胞的 $\Delta\Psi_m$ 明显降低。

Fluo-3的荧光强度与细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的浓度成正比,使用流式细胞仪检测发现, ρ^- HBE细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平明显高于 ρ^+ HBE细胞(表2)。

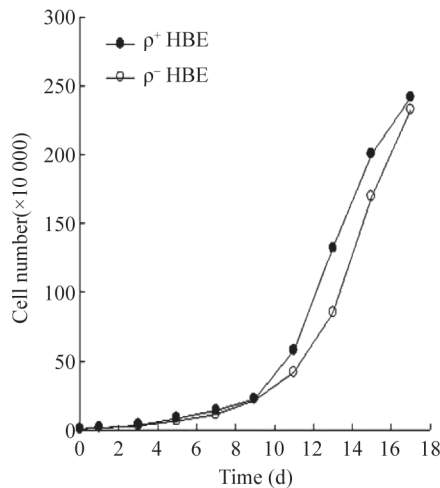


图2 ρ^+ HBE与 ρ^- HBE生长曲线
Fig.2 Growth curves of ρ^+ HBE and ρ^- HBE

表2 ρ^+ HBE与 ρ^- HBE细胞内 $\Delta\Psi_m$ 、 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度比较
Table 2 A comparison between ρ^+ HBE and ρ^- HBE determined by flow cytometric analysis

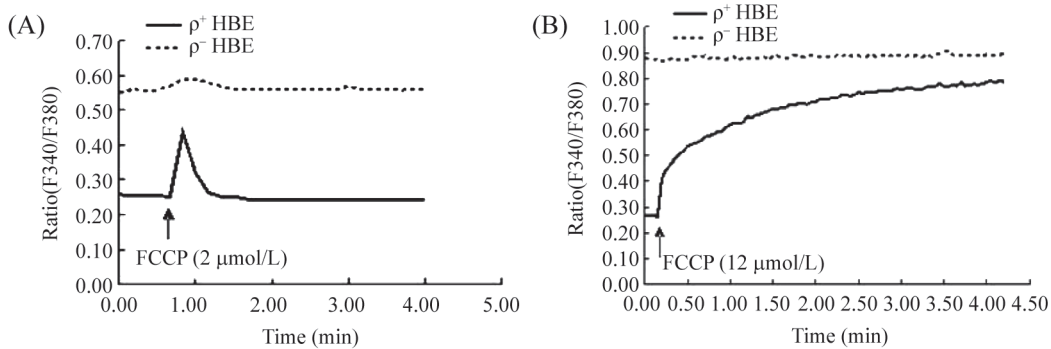
特征	测量单位	正常HBE	mtDNA拷贝数降低的HBE
Property	Units of measurement	ρ^+ HBE	ρ^- HBE
$\Delta\Psi_m$	FL3 Log/FL1 Log [#]	0.91±0.02	0.43±0.01*
$[Ca^{2+}]_i$	Fluorescence units	12.80±0.93	22.70±0.84*

$[Ca^{2+}]_i$: 胞浆 Ca^{2+} 浓度; #: FL1和FL3分别表示绿色和红色荧光强度; * $P<0.05$, 与对照相比。

$[Ca^{2+}]_i$: intracellular Ca^{2+} concentrations; #: intensities of green and red fluorescence are shown in FL1 Log and FL3 Log, respectively; * $P<0.05$, compared with control.

2.4 FCCP对 ρ^- HBE细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

Fura-2是一种特异性钙离子结合荧光染料。Fura-2与钙离子结合后,最大激发波长发生改变,由未结合钙离子时的380 nm移至340 nm,因此检测计算340 nm与380 nm激发下的发射荧光强度比值(F_{340}/F_{380})可以动态检测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。FCCP为线粒体解耦联剂,可使线粒体膜通透性增加并可减少细胞内ATP的生成,抑制线粒体的钙缓冲能力,从而引起线粒体基质内钙离子浓度降低而胞浆钙离子浓度上升。本实验发现,2 $\mu\text{mol/L}$ FCCP可以诱发 ρ^+ HBE细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平短暂升高,即加入2 $\mu\text{mol/L}$ FCCP后的5 s达峰值,上升幅度达(69.4±15.7)%, 15 s后降至基线水平;而 ρ^- HBE在2 $\mu\text{mol/L}$ 的FCCP刺激后的11 s达峰值,上升幅度为(7.2±1.6)%,显著低于对照组HBE细胞($n=11, P<0.05$),加药后的17 s降至基线水平(图3A)。当给予12 $\mu\text{mol/L}$ FCCP的刺激时, ρ^+ HBE细胞于加药后1 s、8 s、4 min, $[Ca^{2+}]_i$ 上升幅度分别为(51.9±12.3)%、(25.9±22.5)%、(196.3±34.6)%,而 ρ^- HBE于加药后相应的时间点波动幅度均小于4%($n=11, P<0.05$),如图3B所示。说明FCCP刺激后, ρ^- HBE细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平的上升幅度减少,而且上升下降的时间延长,提示 ρ^- HBE细胞胞浆钙离子对线粒体解耦联剂的凋亡刺激敏感性下降。



A: 给予2 $\mu\text{mol/L}$ FCCP, ρ^+ HBE和 ρ^- HBE细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度动态变化曲线; B: 给予12 $\mu\text{mol/L}$ FCCP, ρ^+ HBE和 ρ^- HBE细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度动态变化曲线。
A and B: kinetic curves of $[Ca^{2+}]_i$ due to exposure to FCCP(2 $\mu\text{mol/L}$ and 12 $\mu\text{mol/L}$).

图3 FCCP引起 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度变化的动态曲线

Fig.3 Dynamic $[Ca^{2+}]_i$ changes to FCCP in ρ^+ HBE and ρ^- HBE

3 讨论

线粒体除了合成ATP之外还具有多种极为重

要的功能,包括介导代谢、保持离子稳态、细胞增殖和细胞凋亡等^[9]。mtDNA是真核细胞重要的核外

遗传物质, 编码氧化磷酸化过程中的13种多肽, 已有的对线粒体功能及相关疾病的研究提示, mtDNA和nDNA的交互作用维持了线粒体甚至细胞生命的正常功能^[10]。因此, ρ^0 或 ρ^- 细胞成为研究mtDNA与nDNA交互作用及mtDNA在疾病发生进展中作用的重要载体。本实验采用20 ng/mL的EtBr连续培养HBE 60 d, 通过Real-time PCR和mtDNA染色鉴定, 证实此方法可成功获得 ρ^- HBE细胞株, 为研究mtDNA异常对细胞损伤的机制奠定了基础。

我们对比分析了 ρ^+ HBE与 ρ^- HBE的生长速度, ρ^- HBE增殖速度减慢, 这与MOLT-4、淋巴B细胞、RD细胞的结果是一致的, 符合细胞在糖酵解低能量条件下生长的一般规律。同时, 线粒体形态染色结果进一步表明, ρ^- HBE线粒体肿胀萎缩、数量减少, 流式检测结果显示, 线粒体膜电位维持在较低水平, 以上提示mtDNA量降低影响了线粒体的形态结构及功能, 此上三个条件也符合多种mtDNA突变疾病的细胞线粒体形态结构功能的改变^[11-13]。以往实验研究表明线粒体的形态结构及线粒体膜电位在线粒体正常生理功能的发挥中具有重要作用, 本实验 ρ^- HBE静息状态胞浆钙离子浓度升高、给予刺激后钙流变化的敏感性下降, 提示mtDNA量降低与继发的线粒体的结构功能的改变导致细胞钙稳态失调。

作为细胞内普遍存在的第二信使, 钙离子在信号转导过程中发挥重要作用, 它可作为许多酶类的调节因子及激素、细胞因子的效应因子, 广泛参与细胞生长、增殖、分化、衰老、死亡等生理活动, 钙的稳态失调会继发一系列的病理改变。在静息生理状态下, 细胞内钙离子浓度总是维持在极低的水平, 在受到相应刺激后, 细胞能将感受的刺激转化为 Ca^{2+} 在不同细胞组分间的分布差异及浓度的不同振荡形式, 使得细胞能够感知分析不同刺激并做出相应的精细调节反应, 这种在细胞内和细胞间的信号传导协调了细胞的生命活动^[14-15]。细胞内钙离子不同浓度梯度的维持以及应对刺激表现的不同振荡模式都离不开细胞内的各种钙释放通道和钙库的调节。显微电镜观察发现, 线粒体多聚集在内质网膜上的钙释放孔道附近, 线粒体是极为重要的钙缓冲调控细胞器。线粒体基质内维持高钙浓度, 一是为了促进氧化磷酸链加速合成ATP, 以供给细胞应对不同的外界刺激和生理反应, 二是使胞浆内的钙浓度被控制在生理范围内, 避免其他细胞器因为过量

Ca^{2+} 的长时间刺激而受到损伤^[16-17]。本实验的结果显示, 静息状态下, ρ^- 细胞胞浆 Ca^{2+} 维持在较高的水平, 这可能会对细胞内的其他细胞器造成慢性进行性的损害。 ρ^- 细胞对外源性凋亡刺激不敏感, 钙离子不能通过浓度振荡和转移发挥信号转导的作用而促使细胞做出调节反应, 会影响细胞的下游生理功能。Giorgi等^[18]于2012年也因此提出研发维持钙稳态的新药治疗或改善线粒体相关疾病。

综上, 本研究表明, 细胞的mtDNA拷贝数降低可影响细胞的钙信号调节作用, 从而导致胞浆钙离子稳态失衡, 进而加重细胞损伤及病理损害。因此, 对于线粒体基因及结构功能异常的疾病应辅助钙稳态调节药物。

参考文献 (References)

- Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He LP, Whittaker RG, Taylor RW, *et al.* Prevalence of mitochondrial. *Ann Neurol* 2008; 63(1): 35-9.
- Palmieri F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777(7/8): 564-78.
- de Moura MB, Dos Santos LS, van Houten B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease and cancers. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(5): 391-405.
- Davidson MM, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Nesti C. Evidence for nuclear modifier gene in mitochondrial cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46(6): 936-42.
- Leibowitz RD. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *Cell Biol* 1971; 51: 116-122.
- Nass MM. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis *in vivo* in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 1972; 72(1): 211-22.
- Xu N, Luo KQ, Chang DC. Ca^{2+} signal blocker can inhibit M/A transition in mammalian cells by interfering with the spindle checkpoint. *Biochem Res Commun* 2003; 306(3): 737-45.
- Zhang Y, Zhao WL, Zhang HJ, Domann FE, Oberley LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 2002; 62(4): 1205-12.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; 112(4): 481-90.
- Yaffe MP. The mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 1999; 283(5407): 1493-7.
- Vila M, Ramonet D, Perier C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: New clues. *J Neurochem* 2008; 107(2): 317-28.
- Seo AY, Joseph AM, Dutta D. New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 1): 2533-42.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, *et al.* Impaired mitochondrial functions in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(5): 293-307.
- Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell*

- Biol 2003; 5(12): 1041-3.
- 15 Bianchi K, Rimessi A, Prandini A, Szabadkai G, Rizzuto R. Calcium and mitochondria: Mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1742(1/2/3): 119-31.
- 16 Leo S, Bianchi K, Brini M, Rizzuto R. Mitochondrial calcium signalling in cell death. *FEBS J* 2005; 272(16): 4013-22.
- 17 詹启敏. 分子肿瘤学. 北京: 人民卫生出版社(Zhan Qimin. *Molecular Oncology*. Beijing: People's Medical Publishing House), 2005, 403.
- 18 Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, Marchi ED, Marchi S, *et al.* Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* 2012; 12(1): 77-85.

The Effects of Mitochondrial DNA Depletion in Human Bronchial Epithelial Line on Calcium Homeostasis

Wei Hong¹, Xue Lian², Li Bingyan¹, Tong Jian¹, Zhang Zengli^{1*}

(¹Department of Health Toxicology, Soochow University, Suzhou 215123, China;

²Department of Environmental and Occupational Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract Human bronchial epithelial cells (HBE cells) were cultured in culture medium containing ethidium bromide (EtBr) to establish a mitochondrial DNA (mtDNA)-depleted HBE model (ρ^- HBE). Real-time PCR and confocal imaging show that the content of mtDNA in ρ^- HBE selected from limiting-dilution in EtBr-treated cells was 24% of the wide-type HBE. Compared with parent HBE, ρ^- HBE showed a slower growth rate, increased level of intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), decreased condition of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), the magnitude of elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was markedly reduced to FCCP stimulation. These results indicated that the depletion of mtDNA disrupted calcium homeostasis.

Key words mitochondrial DNA; copy number; mitochondrial transmembrane potential; Ca^{2+}

Accepted: February 28, 2012 Received: September 20, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China for International Key Cooperation (No.81020108028)

*Corresponding author. Tel: 86-512-65880074, E-mail: zhangzengli@suda.edu.cn