

人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株建立

张国桥 凌贤龙* 陈正堂

(第三军医大学新桥医院全军肿瘤中心、消化科, 重庆 400037)

摘要 人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株(ρ^0 SK-Hep1)的建立及鉴定。采用溴化乙锭(EB)诱导, PCR、Southern 杂交及选择性培养方法进行鉴定。 ρ^0 SK-Hep1 细胞在含 EB、无尿嘧啶和丙酮酸的选择培养基中从第 1 天始细胞逐渐悬浮、肿胀, 培养第 5 天以后大量悬浮死亡, 且贴壁疏松, 10~12 天细胞完全悬浮死亡。在选择性培养基中可以正常生长增殖成单层, 有少量悬浮。同期非选择培养的 SK-Hep1 细胞生长正常。PCR 结果显示, 细胞色素氧化酶 I、II (COXI、COXII) 及内参 G3PDH 在 SK-Hep1 细胞中均可扩增出相应的条带, ρ^0 SK-Hep1 细胞只见内参条带的形成。Southern 杂交结果显示, ρ^0 SK-Hep1 细胞未见 COXI、COXII 杂交条带形成。经 EB 诱导后成功地获得了 ρ^0 SK-Hep1 细胞株。

关键词 溴化乙锭; Southern 杂交; PCR; 线粒体 DNA; 肝癌

1988 年, Wallace 等^[1]分别发现线粒体 DNA (mtDNA) 突变参与了线粒体脑肌病和 Leber 遗传性视神经病(LHON)的发病过程。随后的研究证实多种疾病的发生与 mtDNA 突变有关, 如线粒体肌病、退行性疾病和肥厚性心脏病等。建立 mtDNA 缺失细胞株(ρ^0 细胞)对于研究线粒体疾病的分子遗传学、发病机制以及基因治疗等都有重要价值。为此, 我们采用溴化乙锭(EB)诱导成功地制备了 ρ^0 SK-Hep1 肝癌细胞株, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 SK-Hep1 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 高糖培养基(DMEM)、胎牛血清及透析的胎牛血清为 Gibco 产品。溴化乙锭(EB)、5'-氧溴脱氧尿嘧啶(BrdU)、丙酮酸钠为 Sigma 产品。24 孔培养板、DNA 胶回收试剂盒为 Omega 产品。Southern 印迹标记与检测试剂盒为 Pierce 产品。细胞色素氧化酶 I、II (COXI、COXII) 探针自己合成。

1.2 细胞培养及 ρ^0 SK-Hep1 肝癌细胞株制备

参照文献报道方法^[2-4], 将 SK-Hep1 细胞在含 100 μ g/L EB、100 mg/L 丙酮酸钠、50 mg/L 尿嘧啶、10% 胎牛血清的培养基中培养。2 天传代一次, 传代至 21 代后, 行细胞计数。将细胞接种到 24 孔培养板, 换用不含 EB 的培养液(含 100 mg/L 丙酮酸钠、

50 mg/L 尿嘧啶、10% 胎牛血清)。采用有限稀释法进行克隆, 挑选其中一个克隆扩增培养。

1.3 ρ^0 SK-Hep1 细胞株鉴定

1.3.1 营养缺陷鉴定 选择处于对数生长期的 SK-Hep1 和 ρ^0 SK-Hep1 细胞, 在不含丙酮酸及尿嘧啶的培养基中培养, 观察细胞生长、形态及死亡情况。采用台盼蓝排除法鉴定活细胞。

1.3.2 Southern 杂交 (1) DNA 提取。按照细胞和组织 DNA 提取试剂盒操作指南提取细胞 DNA, 紫外分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} 的光密度值, 确定 DNA 纯度及含量, 样品放 -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

(2) PCR 扩增。根据文献^[2,5], 采用 PCR 方法分别扩增 COXI、COXII 及 G3PDH。引物序列见表 1。

扩增条件: 在 0.5 ml 离心管中, 分别加入 SK-Hep1 及 ρ^0 SK-Hep1 细胞 250 ng DNA、2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液、4 种 dNTP 各 200 μ mol/L、引物各 10 pmol/L、1.5 μ l 25 mmol/L $MgCl_2$ 、0.5 μ l Taq DNA 聚合酶, 加灭菌双蒸水至总体积 25 μ l, 混匀后离心, 置于 PTC-100 (美国生产) 热循环仪中扩增, 循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存。

取 5 μ l PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,

收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-09-22

国家自然科学基金资助项目(No.30470865)

* 通讯作者。Tel: 023-68774204, E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn

表1 引物序列

引物类型	引物序列	产物大小 (bp)
COXII	上游引物	ATCAAATCAATTGGCCACCAATGGTA
	下游引物	TTGACCGTAGTATACCCCGGTC
COXI	上游引物	ACACGAGCATATTTCACCTCCG
	下游引物	GGATTTTGGCGTAGGTTTGGTC
人 G3PDH	上游引物	ACCACAGTCCATGCCATCAC
	下游引物	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

其余放 -20°C 保存。

(3) Southern 杂交。取 SK-Hep1 细胞和 ρ^0 SK-Hep1 细胞 $5\text{ }\mu\text{g}$ DNA, 以 *Eco*RI 对基因组 DNA 随机酶切, 可见三条大小不一的 DNA 片段形成。随后电泳转膜, 按照试剂盒操作指南采用随机引物法生物素标记 COXI、COXII 及内参 G3PDH 的探针与硝酸纤维素膜杂交, 化学发光法显示杂交条带。

2 结果

2.1 生长缺陷鉴定

倒置相差显微镜下观察 ρ^0 SK-Hep1 细胞在含 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ EB、不含尿嘧啶和丙酮酸的非选择培养基中从第 1 天开始细胞逐渐悬浮、肿胀; 培养第 5 天以后大量悬浮死亡, 细胞孤立存在, 缺乏汇合, 且贴壁疏松; 至选择培养 10~12 天细胞完全悬浮死亡。应用台盘蓝排除法鉴定活细胞, 结果显示第 6 天已无活细胞存在(图 1)。而在含 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ EB、尿嘧啶和丙酮酸的选择培养基中 ρ^0 SK-Hep1 细胞可以正常生长增殖成单层, 有少量悬浮(图 2)。

2.2 PCR 扩增

结果显示, COXI、COXII 及内参 G3PDH 在 SK-Hep1 细胞中均可扩增出相应的条带, 而 ρ^0 SK-Hep1 细胞只见内参条带的形成(图 3)。

2.3 Southern 杂交

生物素分别标记 COXI、COXII 探针, 化学发光法显示杂交条带。结果显示, SK-Hep1 细胞可见 COXI、COXII 杂交条带, ρ^0 SK-Hep 细胞只见内参条带的形成(图 4)。

3 讨论

人类 mtDNA 是一长度为 $16\,569\text{ bp}$ 的双链闭环分子, 主要参与编码线粒体呼吸链酶复合亚单位。完整的线粒体呼吸链由复合物 I~V 构成, mtDNA 编码包括复合物 I (NADH 脱氢酶或 NADH 氧化还原酶的辅酶) 中的 7 个亚单位 ND1~ND6、复合物 III (细



图1 不含尿嘧啶和丙酮酸培养基中培养的 ρ^0 SK-Hep1 细胞 (25 $\times$)

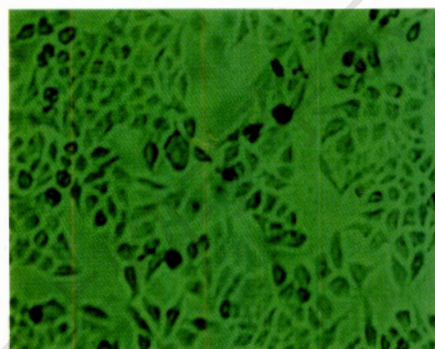


图2 含尿嘧啶和丙酮酸培养基中培养的 ρ^0 SK-Hep1 细胞 (25 $\times$)



图3 PCR 产物电泳图

1: 分子量标准($100\sim 600\text{ bp}$); 2、3: SK-Hep1 细胞 COXI、COXII 扩增结果; 4、5: ρ^0 SK-Hep1 细胞 COXI、COXII 扩增结果, 只见内参 G3PDH 扩增条带。

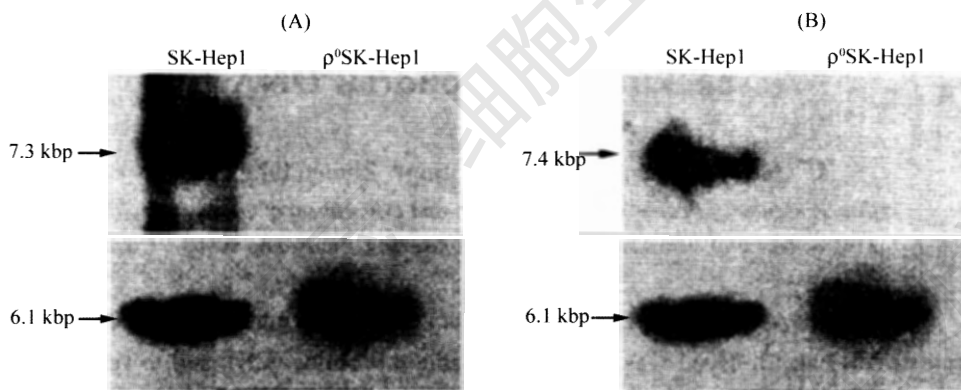


图4 COXI、COXII Southern 杂交结果

(A)、(B)分别为COXI、COXII Southern 杂交图; COXI、COXII在 ρ^0 SK-Hep1细胞未见杂交条带。

胞色素c氧化还原酶)的1个亚单位细胞色素b、复合物IV(细胞色素c氧化酶)的3个亚单位CoI、CoII、CoIII以及复合物V(ATP合成酶)的2个亚单位ATP酶6和ATP酶8等^[6]。

人类第一个线粒体DNA缺失细胞株是King等^[4]在骨肉瘤细胞143B.TK中制备成功的,随后又有很多种细胞被陆续培养成 ρ^0 细胞株,包括143B、GM701、HeLa、A549、NamaLa等,但仍有许多细胞株不能被诱导成功,如HeLa F135、HeLa BU25以及几种来源于Hep3B的肝细胞株。我们在前期实验中用EB诱导了肝癌HepG2及胃癌SGC7901,在细胞诱导至10天左右时细胞逐渐悬浮、肿胀,继而大量悬浮死亡。无mtDNA细胞株的诱导培养成功,为研究线粒体功能、遗传及线粒体疾病提供了细胞模型。

我们用人肝癌SK-Hep1细胞株,采用EB诱导,成功地获得了 ρ^0 SK-Hep1细胞株。经选择性培养、PCR以及Southern杂交鉴定,证实mtDNA完全缺失。该细胞生长稳定,为我们下一步做无核细胞及胞质体融合成功的建立了细胞模型。

EB是一种DNA分子整合剂,其扁平状的分子插入无核蛋白保护的DNA分子层状排列的碱基对之间,从而抑制线粒体DNA的复制和转录。由于mtDNA缺失,不能编码相应的线粒体呼吸链酶复合物亚单位,导致呼吸链功能的障碍,从而失去氧化磷酸化功能。 ρ^0 细胞的生长依赖尿嘧啶和丙酮酸的存在,对尿嘧啶依赖性判断细胞中是否存在线粒体DNA比较敏感可信的指标之一^[4]。我们在 ρ^0 SK-Hep1细胞的选择培养中观察到,SK-Hep1细胞在含EB、不含尿嘧啶和丙酮酸的培养基中第5天就大量死亡,应用台盼蓝染色鉴定活细胞,发现在选择培养第6天以后已无活细胞存在。虽然此时仍有细胞贴壁,但已是死亡细胞。

参考文献 (References)

- [1] Wallace DC *et al. Science*, 1988, **242**: 1427
- [2] Armand R *et al. Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, **196**: 68
- [3] Attardi G *et al. Biochim Biophys Acta*, 1995, **1271**: 241
- [4] King MP *et al. Methods Enzymol*, 1996, **264**: 304
- [5] Park Y *et al. AM J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, **280**: E1007
- [6] Anderson S *et al. Nature*, 1981, **290**: 457

Establishment of Human Hepatocellular Cancer Cell Line Lacking Mitochondrial DNA

Guo-Qiao Zhang, Xian-Long Ling*, Zheng-Tang Chen

(Cancer Center of People's Liberation Army and Department of Gastroenterology,
Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract To establish a human hepatocellular cancer cell line lacking mitochondrial DNA (mtDNA). Human hepatocellular cancer cell line SK-Hep1 was treated by ethidium bromide (EB), and to verify the cell line lacking mtDNA, the cells were cultured in media without uridine and pyruvate, and PCR and southern hybridization were used to detect cytochrome oxidase subunit I (COXI) and II (COXII). After exposure to EB for 1 day, some SK-Hep1 cells began swelling and suspending, almost all cells died for about 10–12 days when cultured in the media without uridine and pyruvate. When SK-Hep1 cells were cultured in the media with EB and uridine and pyruvate for 21 generations, COXI and COXII cannot be amplified, and Southern blot suggested there were not COXI and COXII hybridization bands. Treated By EB, we have successfully established a human hepatocellular cancer cell line lacking mtDNA (p⁰SK-Hep1).

Key words ethidium bromide; Southern hybridization; PCR; mitochondrial DNA; hepatocellular cancer

Received: June 20, 2006 Accepted: September 22, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470865)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68774204, E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn