

定向表达 *COX I* 功能性片段减轻叠氮钠所致线粒体功能障碍

胡昕 谭峰¹ 徐莹 郑易 吕建新*

(温州医学院生命科学院、检验医学院, 温州 325035; ¹温州医学院基础医学院, 温州 325035)

摘要 将人细胞色素 *c* 氧化酶 I 亚型(*COX I*)的功能区域性片段加入线粒体导向序列, 构建 pEGFP-N1-*COX I* 真核表达载体转染 SK-N-SH 细胞, 探讨 *COX I* 定向表达对叠氮钠(NaN_3)引起的 SK-N-SH 细胞线粒体功能障碍的保护作用。结果发现转染 24 h 后外源 *COX I* 基因在细胞内表达明显增加, 并至少持续到 72 h。*COX I* 基因功能区的线粒体定向表达不仅能维持线粒体膜电势, 而且还能抑制 NaN_3 引起的细胞增殖毒性作用。结果显示 *COX I* 功能区域性片段可通过保护线粒体功能、减少氧化应激来减轻 NaN_3 毒性, 从而发挥保护细胞的作用。

关键词 细胞色素 *c* 氧化酶 I 亚型; 叠氮钠; 线粒体

神经细胞的衰老、退变和死亡是人类神经退行性疾病的一个中心特征, 而细胞的这些变化与线粒体息息相关。人类多种神经退行性疾病存在线粒体电子传递链(mitochondrial electron transport chain, METC)缺陷, 而其中细胞色素 *c* 氧化酶(cytochrome *c* oxidase, COX)的活性下降在正常衰老和其他神经退行性疾病中尤为明显^[1,2], 其中线粒体主要表达细胞色素 *c* 氧化酶 I 亚型(*COX I*)。

神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 属于神经系统来源的肿瘤细胞系^[3], 其在细胞形态、生理和生化功能方面与正常的神经细胞相似^[4], 因此其逐渐在神经系统疾病的研究中被广泛应用。本实验通过在 SK-N-SH 细胞中定向表达 *COX I* 功能区域性片段, 观察 *COX I* 在线粒体损伤和线粒体 DNA 突变中的相互作用, 为进一步利用 *COX I* 治疗线粒体缺陷型神经退行性疾病提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与基因序列

SK-N-SH 神经母细胞瘤细胞株购自中国科学院上海细胞库。大肠菌株 JM109 由本实验室保存。连接了线粒体导向序列(MTS)的 *COX I* 功能区域性片段由上海旭冠生物科技发展有限公司合成。

1.2 pEGFP-N1-*COX I* 真核表达载体的构建

含 *COX I* 功能区域性片段的 pEGFP-N1 质粒(Clontech 公司)以 *EcoRI* 与 *XhoI* (TaKaRa 公司)双酶切, 分别回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶(TaKaRa

公司)连接后转化感受态细胞 JM109, 用卡那霉素筛选并进行酶切、PCR 和测序鉴定。

1.3 pEGFP-N1-*COX I* 真核表达载体的转染

常规培养 SK-N-SH 细胞, pEGFP-N1-*COX I* 重组质粒经 PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega 公司)去内毒素制备纯化, 经预实验摸索后, 以质粒 DNA: 梭华-Sofast® (太阳马生物公司)为 1:3 的比例对培养密度达到 60%~70% 的 SK-N-SH 细胞进行转染。24~72 h 后, 用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM, Olympus FV1000)分析报告基因瞬时转染效率。

1.4 *COX I* 表达的检测

1.4.1 Western 印迹 提取 SK-N-SH 细胞总蛋白, BCA 法测定浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE, 转膜, 分别加 *COX I* 一抗 1:800 (Santa Cruz 公司)、 β -肌动蛋白一抗 1:1 000 (Santa Cruz 公司), 4 °C 温育过夜, HRP 标记二抗 1:5 000 (华美公司), 室温温育 1 h, 增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影。

1.4.2 *COX I* 细胞内的表达定位 培养液中加入线粒体特异染料 MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen 公司), 使其终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 37 °C 温育 30 min。

收稿日期: 2008-11-15 接受日期: 2009-04-10

温州市科技计划项目(No.Y20060236)、浙江省教育厅科研项目(No.20061792)和温州医学院科研项目(No.XNK07108)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, Fax: 0577-86689800, E-mail:

ljx@wzmc.net

无血清培养液冲洗 3 次后应用 CLSM 观察。

1.5 SK-N-SH 细胞线粒体损伤的检测

未经转染组和转染 pEGFP-N1-COX I 组的 SK-N-SH 细胞培养一天后, 加入 NaN_3 (Sigma 公司), 使各孔药物浓度分别为 0、16、32、64、128、256 mmol/L, 每个浓度设 3 个复孔, 作用 24 h 后换液, 进行随后的操作。

1.5.1 CCK-8 检测 SK-N-SH 细胞损伤后的细胞活性

每孔加入 CCK-8 (日本株式会社同仁化学研究所) 溶液 10 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 继续温育 2 h。以培养液空白调零, 在酶标仪上读取 450 nm 波长处的吸光度(参比波长 600 nm)。

1.5.2 荧光分光光度法检测细胞中活性氧(ROS)的变化

收集 NaN_3 作用前后的未经转染和转染 pEGFP-N1-COX I 的 SK-N-SH 细胞, 调节细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 加入超氧化物阴离子荧光检测探针 DHE (Sigma 公司) 染色液, 使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 10 min。离心除去含 DHE 的培养液, 重新悬浮细胞于 Hepes 缓冲液(Merck 公司)。荧光分光光度计(SHIMADZU RF-5301PC)测定各孔的荧光强度($\lambda_{\text{ex}} 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 610 \text{ nm}$)。

1.5.3 JC-1 染色 CLSM 观察 NaN_3 对细胞线粒体膜电势的影响

将 JC-1 液(Invitrogen 公司)加入 NaN_3 作用前后的细胞中使其终浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 10 min。用无血清培养液漂洗 3 次后放入 CLSM 下观察。

1.6 统计方法

SPSS 13.0 统计软件处理数据, 运用组间单因素方差分析检验, 数据用均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切和测序鉴定

重组质粒 pEGFP-N1-COX I 的大小约为 5.4 kb, 与预期结果相符。将构建的阳性重组表达质粒 pEGFP-N1-COX I 经双酶切及琼脂糖凝胶电泳分析, 分别在 4.7 kb 和 0.75 kb 处各有一条带, 其片段大小均与预期一致(图 1)。说明目的基因成功地亚克隆入表达载体。该重组表达质粒经测序, 确定 COX I 基因片段正向插入, 并且无碱基突变。

2.2 pEGFP-N1-COX I 真核表达载体的转染

转染后 24 h, COX I 表达明显增加, 转染 48 h 时 CLSM 下显示出较好的转染效果, 可观察到部分完整的细胞形态, 显现出较强的绿色荧光, 瞬时转染效率

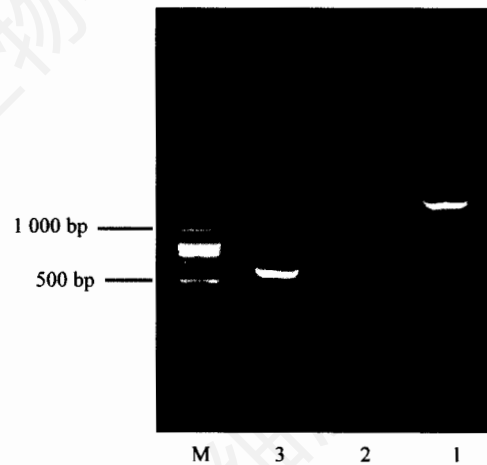


Fig.1 The identification of recombinant plasmid pEGFP-N1-COX I

M: marker; 1: pEGFP-N1-COX I recombination plasma; 2: digested by *EcoRI* and *XhoI*; 3: pEGFP-N1-COX I amplified by PCR.

达 90% 以上。至 72 h 时, 由于 SK-N-SH 细胞的分裂增殖作用, 部分处于细胞质的 COX I 被传至下一代细胞, 致使单个细胞内的荧光素减少, 表现为荧光强度减弱, 并呈逐渐减弱的趋势。空白组的细胞则不发绿色荧光(图 2)。

2.3 COX I 表达的检测

2.3.1 Western 印迹检测

未经转染和转染 pEGFP-N1 空质粒的 SK-N-SH 细胞经 Western 印迹分析显示仅有内源性 COX I 表达, 与对照组和空白组相比, 转染 pEGFP-N1-COX I 48 h 的 SK-N-SH 细胞 COX I 表达明显升高, 而 β -肌动蛋白表达变化不大(图 3)。

2.3.2 细胞内 COX I 的表达定位

CLSM 荧光检测结果显示增强型的绿色荧光融合蛋白呈现在细胞浆内, 并与线粒体特异红色染料重合, 提示线粒体导向序列以及相应基因的正确表达(图 4)。

2.4 细胞线粒体损伤模型生长情况

2.4.1 CCK8 法测定细胞增殖活性

NaN_3 可明显抑制细胞生长。随着 NaN_3 浓度的增加, 转染 pEGFP-N1-COX I 的细胞和未转染的细胞活力均明显降低, 并且表现出相应的浓度依赖性。256 mmol/L NaN_3 作用 24 h 后, 与转染前的 SK-N-SH 细胞相比, 转染 pEGFP-N1-COX I 的细胞表现出相对较高的细胞活力 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.4.2 NaN_3 对 SK-N-SH 细胞内 ROS 水平的影响

实验发现, 32 mmol/L NaN_3 作用时, 未经转染的 SK-N-SH 细胞内 ROS 水平开始增加, 128 mmol/L

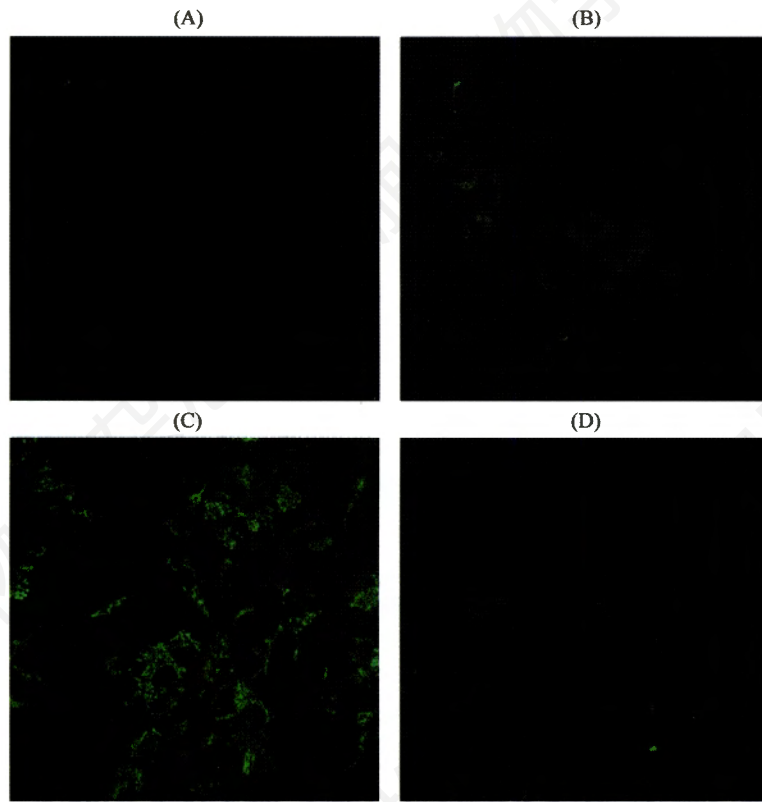


Fig.2 Expression of COX I-EGFP fusion protein at different time points after transfection observed under the laser confocal fluorescent microscopy (200×)

A: non-transfection; B: 24 h after transfection; C: 48 h after transfection; D: 72 h after transfection.

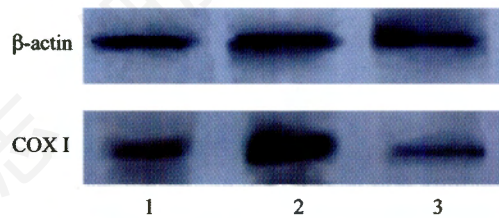


Fig. 3 Analysis of COX I and β -actin expression with Western blot

1: SK-N-SH transfected with pEGFP-N1; 2: SK-N-SH transfected with pEGFP-N1-COX I; 3: non-transfected SK-N-SH.

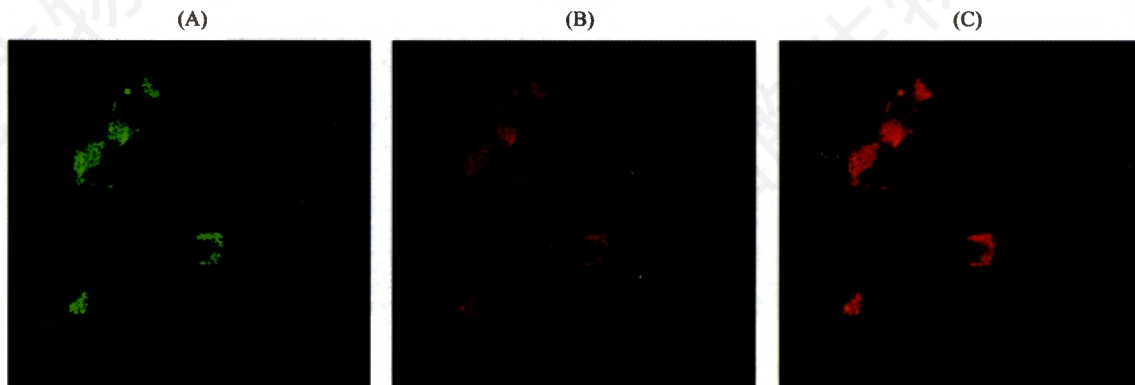


Fig.4 LSCM analysis of the expression of *COX I* in cells at posttransfection (200×)

A: COX I GFP channel (green); B: MitoTracker Red CMXRos channel (red); C: mixed channel of A and B.

NaN₃ 作用时达高峰。提示 NaN₃ 有可能通过细胞内产生大量的 ROS 来抑制细胞生长。转染了 pEGFP-N1-COX I 的 SK-N-SH 细胞能修复高浓度 NaN₃ 带来的影响, 与未经转染组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但在低浓度 NaN₃ 组中无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 6)。

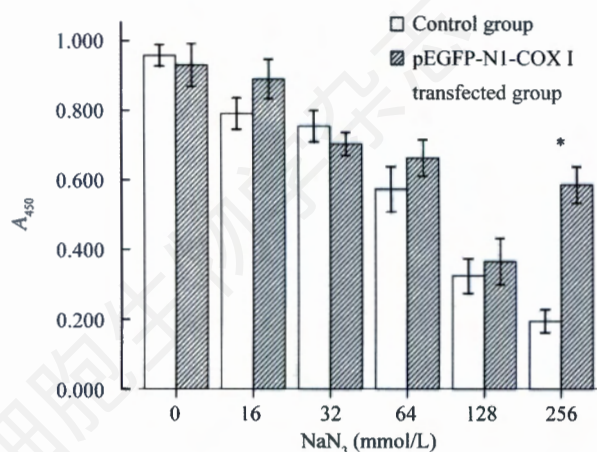


Fig. 5 SK-N-SH Cell viability was reduced by NaN₃ treatment Compared with non-transplanted cell, * $P < 0.05$.

2.4.3 JC-1 染色 CLSM 观察 NaN₃ 对细胞线粒体膜电势的影响 JC-1 是一种阳离子染料, 单体时于 525 nm 处激发发出绿光, 聚集时则于 590 nm 处激发发出红光。线粒体去极化时, JC-1 进入线粒体内减少, 不能形成聚集, 致使红 / 绿荧光强度的比例下降, 甚至呈现单一的绿色。本实验结果显示, 经过 NaN₃ 处理

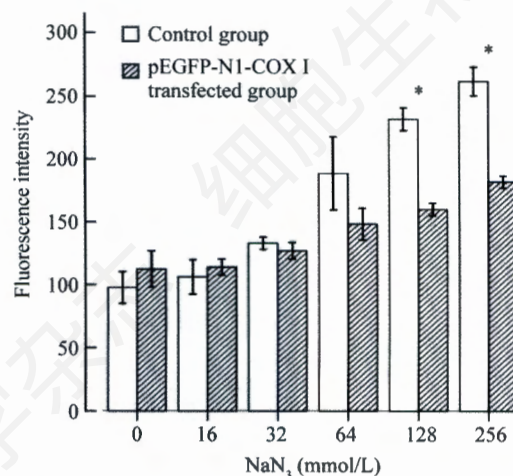


Fig. 6 Effect of NaN₃ on DHE fluorescence intensity in SK-N-SH Compared with non-transplanted cell, * $P < 0.05$.

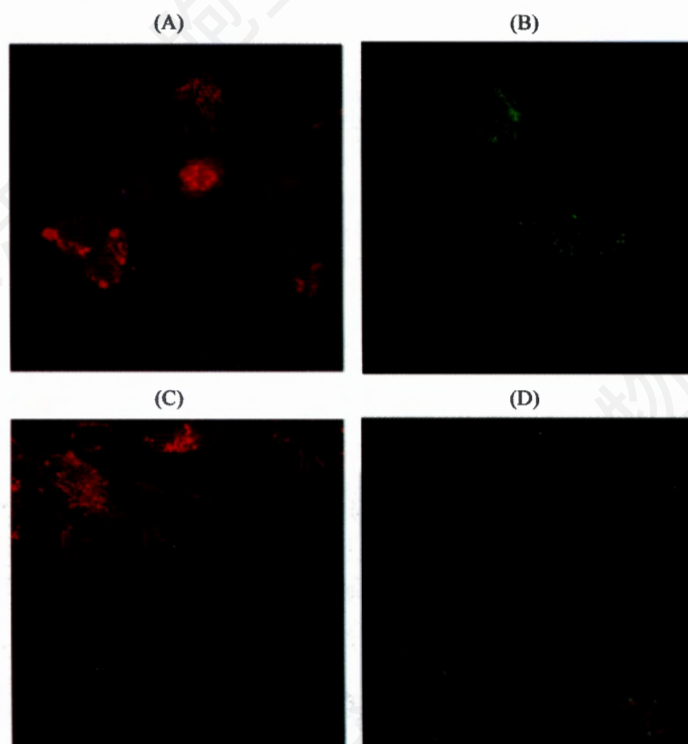


Fig. 7 Effects of NaN₃ on mitochondrial potential and the protective roles of COX I were measured by LSCM with JC-1 after COX I gene was transfected (200 \times)

A: SK-N-SH without NaN₃; B: SK-N-SH with 256 mmol/L NaN₃; C: SK-N-SH that contained pEGFP-N1-COX I without NaN₃; D: SK-N-SH that contained pEGFP-N1-COX I with 256 mmol/L NaN₃.

后, 正常SK-N-SH细胞的桔红色荧光被单一的弥散性绿光所取代, 表明线粒体膜电位明显去极化, 其功能出现障碍。而转染 *COX I* 基因组的细胞能明显修复 NaN_3 带来的影响, 表现为线粒体内 JC-1 的聚集程度明显增加(图 7)。

3 讨论

近年来, *COX* 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病中的作用逐渐受到人们的重视^[5,6]。多项研究证明, AD 患者线粒体内 *COX* 活性表现为特异性的明显减少^[7-11]。因此有些学者推测 *COX* 活性的抑制可能导致培养细胞和动物体内出现类似AD的病理改变。

NaN_3 是作用于线粒体 *COX* 的特异性抑制剂, 其可通过抑制 *COX* 的活性直接损伤线粒体氧化磷酸化过程, 增加羟自由基的生成, 从而引起细胞的氧化性损伤, 长期、缓慢地给予 NaN_3 可导致动物脑内 *COX* 活性下降并引发学习障碍^[12-14]。本研究采用分化程度较低的SK-N-SH细胞株与 NaN_3 共温育, 以模拟神经退行性疾病中神经细胞的损伤效应, 从而构建出既存在线粒体损伤同时又能正常生长的神经细胞损伤模型。经过摸索, NaN_3 作用的最适浓度为 256 mmol/L, 在此浓度下, SK-N-SH细胞的线粒体功能受到抑制但仍能正常生长。研究中还发现转染了 pEGFP-N1-*COX I* 的SK-N-SH细胞只能修复高浓度 NaN_3 带来的影响, 这可能与 DHE 探针主要检测超氧阴离子(O_2^-)有关, 而低浓度 NaN_3 使细胞产生 ROS 可能通过其它的途径分子, 如过氧化氢(H_2O_2)、氢氧自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化脂质(LOOH)等。

本实验选用 *COX I* 中一段主要功能区基因(6 481~7 088 bp)进行表达, *COX I* 是一种 G 蛋白偶联受体^[15], 由于没有文献报道相关维持高转录活性的最小区域和含有重要启动子成分的小序列, 我们对其蛋白质结构选择了 182~396 的多肽位置进行线粒体密码子到通用密码子的转换, 其中包括 4 个铜结合位点、2 个铁结合位点和相应的跨膜区域, 期望在成功表达 *COX I* 的同时能又达到找到高活性最小区域片段的目的。为使 *COX I* 能正常表达同时又能直观检测, 本研究使用 pEGFP-N1 作为真核表达载体, 该载体所含有的巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子, 可使插入其多克隆位点内的外源基因早期立即转录, 该载体 3' 端连接有报告基因可增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因, EGFP 在 488

nm 激发波处能形成鲜明的绿色荧光, 在组织和细胞中能耐受各种处理而保持其发光特性。最终产物为目的基因所表达的蛋白质与荧光蛋白的融合体, 这使得结果非常直观。

未转染的SK-N-SH细胞经过 NaN_3 处理后, 细胞内的线粒体膜电位明显去极化, 功能出现障碍, 而转染 *COX I* 基因组的细胞则能明显修复 NaN_3 带来的影响, 从而提示 *COX I* 确实对神经细胞的衰老有着较大的影响, 并且各种原因所致的 *COX I* 表达抑制或异常是导致细胞及机体衰老的重要因素。当然, 由于本实验只对 *COX I* 的重要功能区域进行了表达和研究, 而对 *COX I* 其他区域在整体表达中可能的调控没有进行研究, 因此是否还有其他调控机制尚不得而知。但本研究对寻找新的神经退行性疾病的治疗靶点还是提供了一定的实验依据, 亦为临床防治神经退行性疾病提供了更多、更深入的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Castellani R, Hirai K, Aliev G, *et al.* Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *J Neurosci Res*, 2002, 70(3): 357-360
- [2] Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Giorgetti B, *et al.* Increased mitochondrial and nuclear gene expression of cytochrome oxidase subunits I and IV in neuronal aging, *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1030: 303-309
- [3] Casulari LA, Dondi D, Maggi R, *et al.* Dexamethasone blocks the migration of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH, *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39(9): 1233-1240
- [4] Grant MK, Cuadra AE, El-Fakahany EE. Endogenous expression of nNOS protein in several neuronal cell lines, *Life Sci*, 2002, 71(7): 813-817
- [5] Merlo PM, Raule N, Catani L, *et al.* Increased transcription of mitochondrial genes for Complex I in human platelets during ageing, *FEBS Lett*, 2004, 558(1-3): 19-22
- [6] 谭小玲, 柳君泽, 曹利飞, 等. 缺氧对大鼠大脑皮质细胞色素氧化酶亚基 I、IV 表达协同性的影响, *生理学报*, 2002, 54(6): 519-524
- [7] Parker WJ, Mahr NJ, Filley CM, *et al.* Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease, *Neurology*, 1994, 44(6): 1086-1090
- [8] Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease, *J Neurochem*, 1994, 63(6): 2179-2184
- [9] Parker WJ, Parks JK. Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization, *Neurology*, 1995, 45(3 Pt 1): 482-486
- [10] Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, *et al.* Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease, *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 24(1-4): 336-340
- [11] Fahy E, Nazarbachi R, Zomorodi M, *et al.* Multiplex fluorescence-based primer extension method for quantitative muta-

- tion analysis of mitochondrial DNA and its diagnostic application for Alzheimer's disease, *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(15): 3102-3109
- [12] Bennett MC, Rose GM. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task, *Behav Neural Biol*, 1992, 58(1): 72-75
- [13] Callaway NL, Riha PD, Wrubel KM, *et al.* Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats, *Neurosci Lett*, 2002, 332(2): 83-86
- [14] 张 兰, 叶翠飞, 张如意, 等。微泵恒速灌注叠氮钠对大鼠学习记忆的影响, *中国行为医学科学*, 2001, 10(1): 1-3
- [15] Varlamov DA, Kudin AP, Vielhaber S, *et al.* Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA *CO I* gene, *Hum Mol Genet*, 2002, 11(16): 1797-1805

Targeted Expression of Domain Regional Fragment of *COX I* Gene Alleviates Dysfunction of Mitochondria Induced by Sodium Azide

Xin Hu, Feng Tan¹, Yin Xu, Yi Zheng, Jian-Xin Lu*

(School of Medical Laboratory Science and School of Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

¹The School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract To study the protective role of targeted expression of cytochrome *c* oxidase I (*COX I*) domain regional fragment in mitochondrial dysfunction and oxidative stress of SK-N-SH cells resulting from sodium azide (NaN_3), a mitochondrial targeting sequencing was inserted into domain regional fragment of *COX I* and the plasmid pEGFP-N1-COX I was constructed and transfected into the SK-N-SH cells. The studies showed that the expression of *COX I* markedly increased at the time of 24 h after transfection and persisted up to 72 h and directional expression of *COX I* domain regional fragment could not only maintain the mitochondrial potential but also inhibit the toxic effect on proliferation of cells induced NaN_3 . These data indicate that *COX I* domain regional fragment could prevent the cells from NaN_3 toxicity, which may be related to the maintenance of mitochondrial function and inhibition of ROS production.

Key words cytochrome *c* oxidase I; sodium azide; mitochondria

Received: November 15, 2008 Accepted: April 10, 2009

This work was supported by the Project of Science and Technology of Wenzhou City (No.Y20060236), the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (No.20061792) and the Project of Science and Technology of Wenzhou Medical Collage (No. XNK07108)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, Fax: 86-577-86689800, E-mail: ljx@wzmc.net