

线粒体 DNA 缺失 SK-Hep1 细胞转线粒体模型的建立及生物学特性分析

何玉琦 凌贤龙*

(第三军医大学新桥医院消化科, 重庆 400037)

摘要 建立了线粒体DNA缺失SK-Hep1细胞(ρ^0 SK-Hep1)转线粒体的模型(SK-Hep1Cyb), 并探讨了线粒体DNA缺失对肝癌细胞恶性表型的影响。以正常人血小板为外源性线粒体供体, 采用聚乙二醇融合方法建立 ρ^0 SK-Hep1 细胞转线粒体模型 SK-Hep1Cyb, 并以 PCR、Southern 杂交及 Western 杂交进行鉴定, MTT 法测定生长曲线, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, Western 杂交检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况。PCR、Southern 杂交及 Western 杂交证实成功建立了 ρ^0 SK-Hep1 细胞转线粒体模型 SK-Hep1Cyb。与 SK-Hep1 和 ρ^0 SK-Hep1 细胞相比, SK-Hep1Cyb 细胞群体倍增时间明显延长, 生长速度减慢, 侵袭能力明显下降, 抗凋亡能力下降; 而 ρ^0 SK-Hep1 细胞与母本细胞相比生长速度与侵袭能力明显增强, 抗凋亡能力增强。采用细胞融合技术成功建立了 ρ^0 SK-Hep1 转线粒体模型。融合细胞肿瘤恶性相关表型如生长速度、侵袭能力、抗凋亡能力明显下降。线粒体DNA损伤对肝癌细胞恶性表型可能有影响, 而恢复正常线粒体功能后或可逆转恶性表型。

关键词 线粒体DNA; 融合细胞; 肝癌; 恶性表型

线粒体是多功能细胞器, 参与了细胞内诸多功能的实现, 如能量代谢、离子平衡、脂质、氨基酸和核酸的合成、细胞运动、增殖以及凋亡等^[1]。线粒体功能不全是肿瘤细胞最重要的特征之一, 线粒体DNA(mtDNA)突变见于多种肿瘤^[2,3]。研究表明, 正常细胞与转化细胞的线粒体存在显著差异。线粒体损伤是否参与肿瘤的形成, 或者它们仅仅是肿瘤发生过程中的继发事件仍不清楚。将肿瘤细胞浆与正常细胞融合形成的杂交细胞可能表现肿瘤源性特征, 提示细胞质成分可能参与了肿瘤的形成。为了研究线粒体损伤对肿瘤细胞相关表型的影响, 我们采用血小板为外源线粒体供体, 构建了SK-Hep1Cyb细胞, 并对细胞的生长速度、侵袭能力、凋亡相关蛋白表达作对比研究, 探讨mtDNA缺失对人肝癌细胞恶性表型的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SK-Hep1 细胞株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)、胎牛血清购自 Gibco BRL 公司。丙酮酸钠、四甲基偶氮唑盐购自 Sigma 公司。尿嘧啶、PEG1500、二甲基亚砷购自 Amresco 公司。

尼龙膜、硝酸纤维素膜购自 Roche 公司。细胞裂解液购自上海申能博彩公司。羊抗人 COX II 单克隆抗体、鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗人 Bax 多克隆抗体和鼠抗人 β -肌动蛋白单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥公司。Matrigel 胶购自 Becton Dickinson 公司。Transwell 小室购自 Corning Costar 公司。限制性内切酶 *EcoRI* 购自 NEB 公司。细胞基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司。Southern 印迹标记与检测试剂盒购自 Pierce 公司。细胞色素氧化酶 I (COX I)、细胞色素氧化酶 II (COX II) 探针自己制备。

1.2 细胞培养

SK-Hep1 细胞在 DMEM 培养基, 含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 g/L 链霉素, 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。线粒体DNA缺失SK-Hep1细胞(ρ^0 SK-Hep1)由本实验室诱导、保存^[4], 在高糖 DMEM 培养基中, 含 100 μ g/L 丙酮酸、50 μ g/L 尿嘧啶, 15% 胎牛血清, 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。

收稿日期: 2008-10-27 接受日期: 2008-12-02

国家自然科学基金(No.30470865)和新桥医院 1520 基金资助

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

1.3 ρ^0 细胞与血小板融合

1.3.1 血小板分离 参照文献^[5]报道方法分离血小板。静脉血(7~20 ml)收集于肝素抗凝管中室温放置 1~4 h, 加入 1/10 体积的 0.15 mol/L NaCl、0.1 mol/L 枸橼酸钠 (pH 7.0), 4 °C, 150 g 离心 14 min。吸出上 3/4 富含血小板的血浆, 4 °C 2 300 g 离心 30~40 min, 血细胞计数器计数血小板数量, 片状沉淀以 10 ml 生理盐水重悬(0.15 mol/L NaCl、0.015 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.4, 25 °C)。

1.3.2 血小板与 ρ^0 SK-Hep1 细胞融合 制备 SK-Hep1Cyb 细胞: 血小板悬液($1.4 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 个)在 15 °C 2 300 g 离心 20 min, 片状沉淀覆盖以 2 ml ρ^0 SK-Hep1 细胞($10^5 \sim 10^6$ 个), 160 g 离心 5~10 min, 吸尽上清液, 沉淀以 100 μ l 聚乙二醇(PEG)溶液(5 g PEG 1500, 1 ml 10% 二甲基亚砷, 4 ml DMEM)充分悬浮。室温放置 1 min, 向悬液中加入 10 ml DMEM 溶液(含 100 μ g/L 丙酮酸、50 μ g/L 尿嘧啶, 10% 胎牛血清)。将细胞悬液分种于 5 个 50 ml 培养瓶中, 三天后换用选择培养基(DMEM 含 10% 胎牛血清, 不含丙酮酸、尿嘧啶)。经选择培养 7 天后, 于培养瓶中可见单个融合细胞克隆形成。

1.4 SK-Hep1Cyb 细胞鉴定

1.4.1 Southern 杂交 (1) DNA 提取 按细胞和组织 DNA 提取试剂盒操作指南, 从 5×10^6 个细胞中提取基因组 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, 样品于 -20 °C 贮存备用。(2) PCR 扩增 根据文献^[6,7], 采用 PCR 方法分别扩增 COX I、COX II 及 G3PDH。引物序列见表 1。扩增条件: SK-Hep1、SK-Hep1Cyb 及 ρ^0 SK-Hep1 细胞基因组 DNA 各 100 ng、2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液、200 μ mol/L dNTP、引物各 10 pmol/L、1.5 μ l 25 mmol/L MgCl₂、0.5 U 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 热循环仪中扩增。循环条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s $\rightarrow$ 55 °C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μ l PCR 产物经

1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其余于 -20 °C 保存。(3) Southern 杂交 取 SK-Hep1 细胞、SK-Hep1Cyb 细胞和 ρ^0 SK-Hep1 细胞 DNA 各 6 μ g, 以 EcoRI 对基因组 DNA 进行随机酶切, 取 5 μ l 酶切产物电泳观察酶切效果。经酚、氯仿抽提, 无水乙醇、醋酸钠浓缩纯化后, 回收产物用 0.7% 的琼脂糖凝胶 60 V 电压电泳 4~5 h, 脱嘌呤、碱变性、酸中和, 20 $\times$ SSC 为转移缓冲液, 毛细管法将分离的 DNA 片段转移到尼龙膜上。按照 Pierce 试剂盒操作指南采用随机引物法标记生物素探针 COX I、COX II 及内参 G3PDH, 将标记的探针与尼龙膜杂交, 化学发光法显示杂交条带。

1.5 Western 杂交

应用组织细胞裂解液分别裂解 SK-Hep1 细胞、 ρ^0 SK-Hep1 细胞和 SK-Hep1Cyb 细胞得到细胞总蛋白。以牛血清蛋白(BSA)为标准品, 考马斯亮蓝法进行蛋白质定量。根据测得的总蛋白浓度, 每例标本取总蛋白 20 μ g, 10%SDS-PAGE 分离, 半干法转印于 PVDF 膜上。脱脂奶粉封闭。1:500 稀释 COX II 一抗, 1:1 000 稀释 Bcl-2、Bax 和 β -肌动蛋白一抗, 与经封闭液处理的 PVDF 膜 4 °C 温育过夜。1:10 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温温育 1 h, 加 ECI 发光剂, 在 5 min 内显影定影, 胶片洗涤干燥后, 记录结果。Quantity One 图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)进行条带吸光度分析, 以目的蛋白 Bcl-2 与 Bax 条带灰度的比值进行分析。相同的细胞重复 3 次求其均值。

1.6 细胞生长状态测定

将对数生长期的 SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞经胰蛋白酶消化后制成 6×10^4 个/ml 的单细胞悬液。分别接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l (1.2×10^3 个/孔), 各设 6 个平行孔, 用 MTT 法每天测吸光度值。连续 5 天, 实验完成后以培养时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。调整细胞数为 6×10^3 个/ml, 将细胞悬液以每孔 1 ml 接种至 24 孔板中, 每种细胞接种 15 孔, 置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱内培养。从第 1 天开始采用台盼蓝染色法, 血

Table 1 Primer sequences

Primer		Sequences (5'-3')	Products (bp)
COX I	Upstream	ACACGAGCATATTTCACCTCCG	336
	Downstream	GGATTTTGGCGTAGGTTTGTC	
COX II	Upstream	ATCAAATCAATTGGCCACCAATGGTA	297
	Downstream	TTGACCGTAGTATACCCCGGTC	
G3PDH	Upstream	ACCACAGTCCATGCCATCAC	500
	Downstream	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

细胞记数板计数活细胞, 每种细胞每日取 3 孔, 计算均值, 连续 5 天。按文献^[8]计算群体倍增时间。

1.7 Transwell 细胞侵袭实验

Transwell 小室(膜孔径 0.8 μm), 培养板底部加入 500 ml 无血清的 NIH3T3 培养液, 小室底部加入 100 μl Matrigel 胶(1:1 稀释), 使胶均匀覆盖底部。将已消化好的细胞悬液(5×10^4 个细胞)加入小室并均匀覆盖在胶上, 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养 36 h 后, 轻轻擦去小室底部的 Matrigel 胶及未浸润的细胞, 无水乙醇固定, 台盼蓝染色, 光镜下观察并记录进入下室 5 个不同 200 倍视野下的细胞数, 以侵袭细胞数目反映细胞的侵袭状况。每种细胞平行设 3 个小室。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件, 行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增

COX I、COX II 及内参 G3PDH 在 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 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 1)。

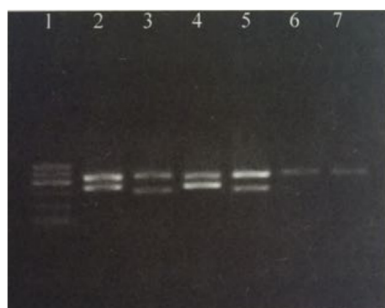


Fig.1 PCR products electropherogram

1: Marker (100—600 bp); 2, 3: SK-Hep1 cells; 4, 5: SK-Hep1Cyb cells; 6, 7: ρ^0 SK-Hep1 cells.

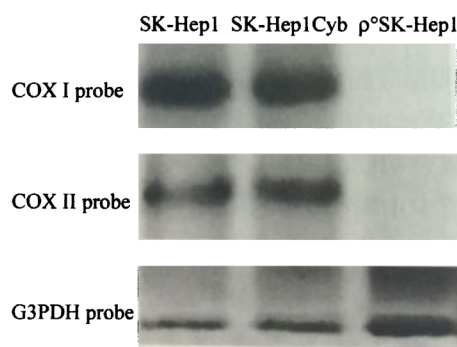


Fig.2 COX I and COX II Southern hybridization

2.2 Southern 杂交

生物素分别标记 COX I、COX II 探针, 化学发光法显示杂交条带。下图为 COX I (7.3 kb)、COX II (7.4 kb)、G3PDH (6.1 kb) Southern 杂交图, 结果显示, SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞可见 COX I、COX II 杂交条带, ρ^0 SK-Hep1 细胞只见内参条带的形成(图 2)。由此可以确定 ρ^0 SK-Hep1 细胞转入线粒体成功。

2.3 COX II Western 杂交结果

SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞可见 COX II 杂交条带, ρ^0 SK-Hep1 细胞只见内参条带的形成(图 3)。由此可以确定线粒体 DNA 编码蛋白功能恢复。

2.4 细胞生长速率

以培养时间为横坐标轴, 以细胞培养 1~5 天的吸光度值为纵坐标轴, 绘制生长曲线(图 4)。由生长曲线可以看出, 三种细胞增殖存在明显差异, SK-Hep1Cyb 细胞生长最慢, 而 ρ^0 SK-Hep1 细胞生长最快。SK-Hep1 细胞、 ρ^0 SK-Hep1 细胞和 SK-Hep1Cyb 细胞群体倍增时间分别是: (25.2 ± 0.2) h、(20.9 ± 0.4) h、(33.4 ± 0.1) h, 三者两两比较差异显著($P < 0.01$)。

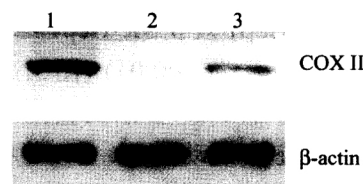


Fig.3 COX II expression

1: SK-Hep1 cells; 2: ρ^0 SK-Hep1 cells; 3: SK-Hep1Cyb cells.

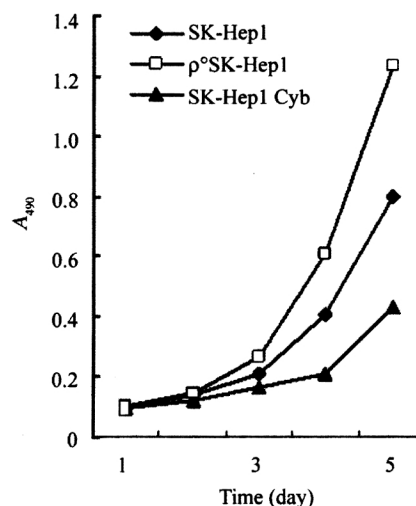


Fig.4 Cell growth curves determined by MTT

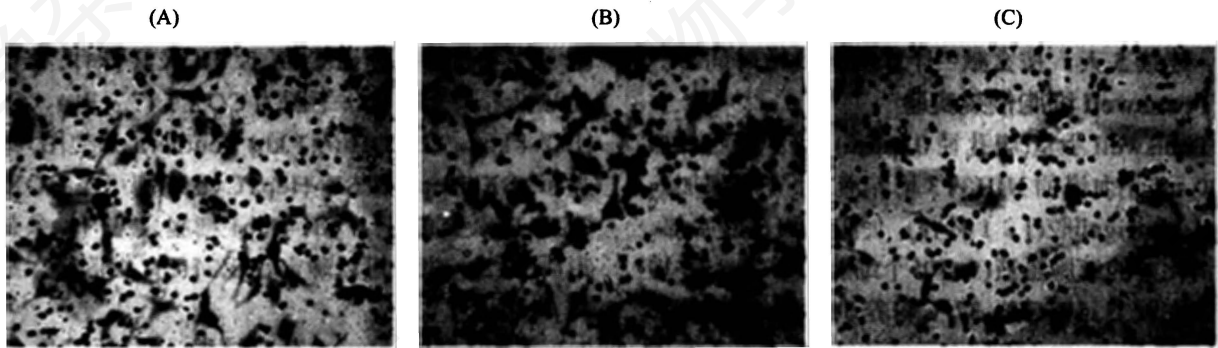


Fig.5 Transwell invasion test (200×)
A: SK-Hep1 cells; B: ρ°SK-Hep1 cells; C: SK-Hep1Cyb cells.

Table 2 Invasion test of the cell lines	
Cell lines	Transwell invasion test
SK-Hep1	28.2±3.8
ρ°SK-Hep1	36.8±3.7**
SK-Hep1Cyb	21.6±4.4*

* $P<0.01$, vs SK-Hep1 cells; ** $P<0.01$, vs SK-Hep1 cells.

2.5 Transwell 细胞侵袭实验

细胞侵袭试验结果显示, ρ°SK-Hep1 细胞侵袭能力最强, 穿过细胞数最多, SK-Hep1Cyb 细胞侵袭能力最差, 低于 SK-Hep1 及 ρ°SK-Hep1 细胞。三种细胞相互间差异有显著性($P<0.01$) (图 5, 表 2)。

2.6 Bcl-2、Bax Western 杂交结果

Western 印迹 β- 肌动蛋白、Bcl-2 和 Bax 蛋白分子量大小分别为 43 kDa、28 kDa 和 23 kDa, Quantity One 图像分析系统分析后, 三种细胞 Bcl-2 与 Bax 条带灰度的比值(Bcl-2/Bax)分别是: SK-Hep1 细胞 0.53 ± 0.06 、ρ°SK-Hep1 细胞 0.61 ± 0.03 、SK-Hep1Cyb 细胞 0.43 ± 0.05 。由于 Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时可实现 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能^[9], 异源二聚体比值增高, 细胞抗凋亡能力增强。通过对比值的分析可得到, ρ°SK-Hep1 细胞抗凋亡能力强, 而转入正常线粒体的 SK-Hep1Cyb 细胞抗凋亡能力较差。

3 讨论

早在 1930 年 Warburg 就提出线粒体功能不全可能导致细胞去分化, 进而参与细胞癌变过程, 但直到现在也没有直接的证据显示 mtDNA 突变与致癌作用存在因果关系。本研究中, 我们以 PEG 作为助溶剂, 采用细胞融合法, 将正常人血小板转入 ρ°SK-Hep1 细胞中, 成功建立了转线粒体细胞模型——SK-Hep1Cyb, PCR、Southern 杂交及 Western 杂交对细胞模型进

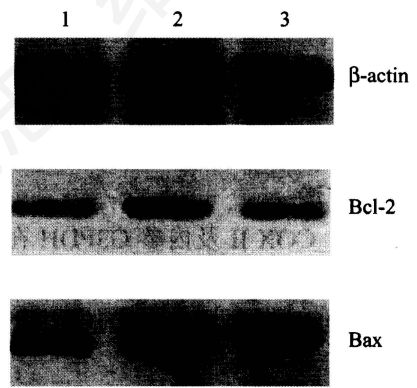


Fig.6 Protein expression of Bcl-2 and Bax
1: SK-Hep1 cells; 2: ρ°SK-Hep1 cells; 3: SK-Hep1Cyb cells.

行验证, 确定线粒体转入成功。

对 SK-Hep1、ρ°SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞生物学行为进行对比分析显示, SK-Hep1Cyb 细胞生长速度明显下降, 群体倍增时间延长, 而 ρ°SK-Hep1 细胞生长速度明显加快。Transwell 细胞侵袭实验显示 SK-Hep1Cyb 细胞侵袭能力明显下降, 而 ρ°SK-Hep1 细胞侵袭能力较母本细胞增强。突变 mtDNA 存在复制优势, 而含有 mtDNA 突变, 或者肿瘤源性特征 mtDNA 突变的细胞有着增生的优势, ρ° 细胞有着增生和形成肿瘤的能力^[10]。肿瘤细胞线粒体 DNA 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, 失去氧化磷酸化功能, ATP 在细胞质中由糖酵解产生。任何导致细胞内氧化磷酸化降低的事件都为转化或者肿瘤细胞提供增生优势^[11]。在肾癌从低侵袭到高侵袭细胞线粒体损伤的程度逐渐增加, 并与氧化磷酸化容量的减低一致。

线粒体损伤影响肿瘤细胞表型的机制尚不明。采用 Western 杂交对细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2

和 Bax 表达进行检测, 并通过 Quantity One 图像分析系统对三种细胞 Bcl-2 与 Bax 条带灰度的比值进行分析, 三种细胞 Bcl-2 与 Bax 条带灰度的比值分别是: SK-Hep1 细胞 0.53 ± 0.06 、 ρ^0 SK-Hep1 细胞 0.61 ± 0.03 、SK-Hep1Cyb 细胞 0.43 ± 0.05 , 由此我们认为, 当肿瘤细胞恢复正常线粒体功能后, 抗凋亡能力下降。Bcl-2 家族蛋白通过调节线粒体外膜完整性而在细胞凋亡中起关键作用。Bcl-2、Bcl-XL 阻止凋亡蛋白释放并保护线粒体外膜完整性, 而促凋亡 Bcl-2 家族成员, Bax、Bak 诱导外膜通透性增加, 使促凋亡因子从线粒体释放^[12]。Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡。当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡; Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则实现了 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能^[9]。Bcl-2 与 Bax 蛋白量的比率决定异二聚体(Bcl-2/Bax)与同二聚体(Bax/Bax)的比值, 这对决定细胞凋亡的易感性起关键作用, 更有认为 Bcl-2/Bax 的比率是调节细胞死亡的可变电阻器^[13]。 ρ^0 细胞与母本细胞相比有明显的抗凋亡能力, 甚至暂时缺失 mtDNA 的细胞对抗肿瘤药物也有抵抗作用。细胞内的线粒体密度可决定细胞对某些抗肿瘤药物的敏感程度^[14-16]。有研究认为 ρ^0 细胞的抗凋亡能力, 与 ROS 产生减少不能触发线粒体通透性转运孔开放发挥促凋亡功能有关^[14]。转入正常线粒体 DNA 的 SK-Hep1Cyb 细胞抗凋亡能力下降。而有线粒体 DNA 突变的母本细胞和线粒体 DNA 缺失的 ρ^0 SK-Hep1 细胞却有较强的抗凋亡能力。

肿瘤增殖需要大量的能量, 恶性肿瘤细胞通常对低氧耐受并伴有无氧糖酵解增加, 参与糖酵解过程的酶表达增加, 如己糖激酶(hexokinase, HK)是糖酵解途径的第一个限速酶, 在肿瘤细胞中不仅 HK 表达量和总体活性增强, 而且 HK 亚型也发生了改变^[17], 使得肿瘤组织在缺氧情况下, 仍能保证足够的能量。ANT 是位于线粒体内膜的跨膜蛋白, 介导 ADP 和 ATP 的交换, 将 ATP 转运到细胞质中。ANT-1 在正常细胞中的表达远高于 ANT-2 的表达, 编码 ANT-2 的基因在正常细胞中被抑制而在人肿瘤中过表达^[18]。据此可以推测肿瘤细胞通过上调 ANT-2 含量, 以及时将线粒体合成的 ATP 转运到胞质中, 为细胞代谢提供能量。有研究认为^[19,20], mtDNA 缺失极有可能是通过抑制凋亡和产生肿瘤相关蛋白来影响肿瘤细胞的进展和转移。抗凋亡 Bcl-2 蛋白与细胞增殖和凋亡关系密切, 可启动细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 使细胞获得耐药性^[21]。而我们对三种细胞凋亡相关蛋白对比

研究发现, ρ^0 SK-Hep1 细胞抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达明显增加, 增殖加快, 抗凋亡能力增强, 与前述结论相符。由此我们认为线粒体 DNA 突变或缺失后肿瘤细胞生长、侵袭及抗凋亡能力增加与上述机制或许有联系。

参考文献(References)

- [1] Modica-Napolitano J, Singh KK. Mitochondrial dysfunction in cancer, *Mitochondrion*, 2004, 4(5-6): 755-762
- [2] Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science*, 1999, 283 (5407): 1482-1488
- [3] Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis, *Life Sci*, 2001, 69(25-26): 2957-2964
- [4] 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株建立, *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 127-130
- [5] Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, et al. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals — and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers, *Am J Hum Genet*, 1994, 54(6): 966-974
- [6] Armand R, Channon JY, Kintner J, et al. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells), *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196(1): 68-79
- [7] Park KS, Nam KJ, Kim JW, et al. Depletion of mitochondrial DNA alters glucose metabolism in SK-Hep1 cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280(6): E1007- E1014
- [8] 张立阳, 赵玉沛, 吴元德, 等. 胰腺癌阿霉素耐药细胞株 SW1990/ADM 的建立及其耐药机理研究, *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(1): 46-50
- [9] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis, *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887-896
- [10] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma, *Carcinogenesis*, 2002, 23(5): 759-768
- [11] Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, et al. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting, *FASEB J*, 2002, 16(9): 1010-1016
- [12] Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, et al. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins, *Essays Biochem*, 2003, 39: 73-88
- [13] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death, *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6): 327-332
- [14] Singh KK, Russell J, Sigara B, et al. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents, *Oncogene*, 1999, 18(48): 6641-6646
- [15] Qian W, Nishikawa M, Haque AM, et al. Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(6): 1466-1475
- [16] Biswas G, Guha M, Avadhani NG. Mitochondria-to-nucleus stress

- signaling in mammalian cells: Nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis, *Gene*, 2005, 354: 132-139
- [17] Lee MG, Pedersen PL. Glucose metabolism in cancer: importance of transcription factor-DNA interactions within a short segment of the proximal region of the type II hexokinase promote, *J Biol Chem*, 2003, 278 (42): 41047-41058
- [18] Yasuda S, Arii S, Mori A, *et al.* Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance, *J Hepatol*, 2004, 40(1): 117-123
- [19] Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, *et al.* Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion, *EMBO J*, 2001, 20(8): 1910-1920
- [20] Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Zaidi M, *et al.* Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NF κ B/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of I κ B β , *J Cell Biol*, 2003, 161(3): 507-519
- [21] Hellwinkel OJ, Muller J, Pollmann A, *et al.* Osteosarcoma cell lines display variable individual reactions on wild type p53 and Rb tumor-suppressor transgenes, *J Gen Med*, 2005, 7(4): 407-419

Establishment of Transmitochondrial Cell Model for SK-Hep1 mtDNA Depleted Cells and Its Biological Characteristics Analysis

Yu-Qi He, Xian-Long Ling*

(Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract To establish ρ^0 SK-Hep1 cells transmitochondrial model (Cybrids) and analyze mitochondrial DNA (mtDNA) depletion on hepatoma cell's malignant phenotypes. Normal human blood platelets were used as mitochondrial donors, and polyethylene glycol was used as fusion promoting reagent to establish transmitochondrial cell model. These cybrids were confirmed by PCR, Southern hybridization and Western blot. Cells growth status and their invasion capability were detected by MTT assays and Transwell chamber respectively. Western blot were carried out to analyze the expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax. PCR, Southern hybridization and Western blot confirmed that cybrids cells had objective fragments of mtDNA and positive COX II activity. Cybrids cells showed lower growth rates and less invasive capability than SK-Hep1 and ρ^0 SK-Hep1 cells. Otherwise, ρ^0 SK-Hep1 cells had higher growth rates and stronger invasive capability than its parental cells. The ability of apoptotic resistance was highest in ρ^0 SK-Hep1 cell but reversely in SK-Hep1Cyb cell. ρ^0 SK-Hep1 cells transmitochondrial model was successfully established. The cybrid cells showed lower growth rates, less invasive capability and decreased anti-apoptotic ability. Damage to mtDNA might have an effect on malignant phenotypes of human hepatoma cells, and those might be reversed by transferring normal mitochondria to the mtDNA depleted cells.

Key words mitochondrial DNA; cybrids; hepatocellular carcinoma; malignant phenotypes

Received: October 27, 2008

Accepted: December 2, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470865) and 1520 Foundation of Xinqiao Hospital

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