

线粒体DNA单体型M8a对转线粒体细胞 线粒体能量代谢的影响

温超玮 仇如意 胡念琪 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 为了观察线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)单体型M8a对细胞线粒体能量代谢的影响, 该研究利用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导血小板-细胞融合技术, 构建mtDNA单体型M8a和G2a转线粒体细胞(transmitochondrial cytoplasmic hybrid cell, cybrid)模型。后续运用Real-time PCR检测细胞mtDNA拷贝数和RNA转录水平, 多功能酶标仪检测细胞活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP), 线粒体呼吸测定仪检测细胞内源性氧呼吸(oxygen consumption, OC)情况。结果表明, 与G2a细胞相比, M8a细胞mtDNA拷贝数和线粒体轻链(L链)转录水平明显降低($P < 0.01$), 细胞基础耗氧量、ATP合成耗氧量、最大氧呼吸能力和MMP显著下降($P < 0.05$), 细胞ROS水平显著上升($P < 0.05$)。mtDNA单体型M8a细胞的线粒体呼吸功能受损, 可能增加了该单体型人群罹患2型糖尿病的风险。

关键词 mtDNA单体型; 转线粒体细胞; mtDNA拷贝数; 转录; 线粒体能量代谢

Effect of Mitochondrial DNA Haplogroup M8a on Mitochondrial Energy Metabolism of Transmitochondrial Cybrids

Wen Chaowei, Qiu Ruyi, Hu Nianqi, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University,
Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China)

Abstract To observe the effects of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroup M8a on mitochondrial energy metabolism, transmitochondrial cytoplasmic hybrid cells (cybrids) from haplogroups M8a and G2a were established in this study. mtDNA copy numbers and transcriptional levels were detected by Real-time qPCR. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by Microplate Reader. Mitochondrial respiration was measured by Oxygraph-2k high-resolution respirometry. The results showed that mtDNA copy numbers and light-strand transcriptional levels remarkably decreased, basal respiration, respiration for ATP production, maximal respiration and MMP significantly decreased, while ROS production markedly increased in cybrid cells from mtDNA haplogroup M8a compared with haplogroup G2a cybrids. The results indicated that mtDNA haplogroup M8a might contribute to the risk of type 2 diabetes mellitus.

Keywords mitochondrial DNA haplogroup; transmitochondrial cybrids; mtDNA copy number; transcription; mitochondrial energy metabolism

收稿日期: 2017-01-09 接受日期: 2017-03-13

高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20133321110001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689776, E-mail: jxlu313@163.com

Received: January 9, 2017 Accepted: March 13, 2017

This work was supported by Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (Grant No.20133321110001)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689776, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2017-04-18 14:55:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170418.1455.012.html>

线粒体稳态在细胞生长中扮演着非常关键的角色,包括维持线粒体的完整性、线粒体的质量、生物能量以及代谢功能^[1-3]。多项研究表明,细胞发生能量代谢的改变不仅包括核基因的改变,还包括mtDNA突变和mtDNA拷贝数的变化,而mtDNA遗传信息的改变能够引起钙离子稳态、呼吸链复合体活性、mtDNA复制和转录等线粒体功能的改变^[4-7]。mtDNA上特定的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点定义了特定的mtDNA单体型。目前,研究者们普遍认为,经过自然选择保存下来的mtDNA单体型既可有也可不利^[8]。同时,多项case-control研究分析表明,在衰老以及糖尿病、阿尔茨海默症等疾病中,不同的mtDNA单体型可能成为其保护性因素或是风险因子^[9-12]。这也说明,不同mtDNA单体型可能对细胞线粒体功能的发挥以及机体对疾病的易感性产生了一定的影响。

转线粒体细胞是近年来用于研究线粒体相关疾病的最热门的细胞模型之一。通过在mtDNA缺失(ρ^0)细胞基础上再转入外源线粒体,从而对转入的mtDNA突变进行表型和功能分析,研究其是否能够引起mtDNA复制和转录、呼吸链复合体活性、有氧糖酵解作用等细胞能量代谢方面的改变^[13-14]。

本实验室前期通过线粒体基因筛查和流行病学研究发现,mtDNA单体型M8a与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发病有关。在此基础上,我们运用细胞融合技术成功构建了mtDNA单体型M8a和G2a单型体的转线粒体细胞,并对转线粒体细胞mtDNA拷贝数、转录水平、细胞活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平以及内源性氧呼吸作用等的变化进行比较分析,以初步探讨不同mtDNA单体型对转线粒体细胞在线粒体功能的影响,为进一步研究mtDNA单体型M8a在糖尿病发病过程的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

定义为mtDNA单体型M8a的个体1例,定义为mtDNA单体型G2a的个体1例。

1.2 主要材料和试剂

线粒体DNA缺失人骨肉瘤(ρ^0 143B)细胞株、透析/普通胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、尿嘧啶核苷(uridine)均购自Sigma公司;高糖DMEM培养

液(pyruvate free)购自Hyclon公司;聚乙二醇(PEG-1500)、DMSO、胰蛋白酶细胞消化液均购自碧云天生物技术研究所;FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)购自Roche公司。

1.3 转线粒体细胞的构建和线粒体单型体的鉴定

根据文献[15],分别分离得到线粒体单体型M8a和G2a的健康体检者血小板沉淀,收集洗涤后的 ρ^0 143B细胞轻柔加入到血小板沉淀上,300 \times g离心7 min。弃上清,加入新鲜配制、37 $^{\circ}$ C预热的42% PEG溶液,于1 min内快速充分地混匀,静置30 s后加入DMEM培养液(10% FBS、50 μ g/mL尿嘧啶、100 μ g/mL 丙酮酸盐)培养。72 h后换用DMEM选择培养液(10% FBS、无尿嘧啶、无丙酮酸盐)进行选择培养。30 d后挑取单克隆细胞进行扩大培养。分别收集线粒体单体型M8a和G2a的转线粒体细胞,手工法提取细胞基因组DNA。采用mtDNA测序的方法测定细胞SNP位点。

1.4 mtDNA拷贝数和转录水平的检测

分别收集处于对数生长期的细胞,采用手工法提取细胞基因组DNA。采用Real-time PCR(SYBR Green)的方法,以18S rDNA和18S rRNA为内参基因,分别对mtDNA拷贝数和RNA转录进行检测^[16]。引物序列如表1所示。

1.5 细胞内源性氧呼吸的检测

分别收集单体型M8a和G2a的转线粒体细胞,500 \times g离心3 min后弃上清。加入500 μ L新鲜配制的TDs(1 \times TD加入10% CS)重悬,500 \times g离心3 min后再弃上清,用200 μ L TD重悬细胞并加入预先平衡的Oxygraph-2k高分辨线粒体呼吸测定仪检测仓内。当检测基线平衡于15~25,用微量加样器加入3.5 μ L寡霉素(oligomycin)以抑制复合体V的活性,检测并记录细胞非耦联性氧呼吸反应。3~5 min待测定线平衡后,再加入3 μ L羰基氰对三氟甲氧基苯腙[carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP],检测并记录细胞去耦联后的最大氧呼吸容量。最后从仓内吸取50 μ L液体,采用BCA试剂盒检测的方法对细胞样本进行蛋白质含量的测定和氧呼吸结果的校正。

1.6 MMP的检测

分别向mtDNA单体型M8a和G2a的转线粒体细胞加入终浓度为30 nmol/L的四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine methyl ester, TMRM)工作液(3 μ L 30 μ mol/L TMRM储存液和3 mL DMEM培养液混合),

表1 Real-time qPCR引物序列
Table 1 Primer sequences for Real-time qPCR

检测项目 Project	引物名称 Primer	引物序列 Sequence
mtDNA copy numbers	nDNA (18S ribosomal DNA)	F: 5'-TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC-3' R: 5'-CGC TGA GCC AGT CAG TGT-3'
	mtDNA (Human-tRNA leucine 1, transcription terminator and 5S-like sequence)	F: 5'-CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT-3' R: 5'-TGG CCA TGG GTA TGT TGT TAA-3'
Transcriptional levels	18S rRNA	F: 5'-GAC GAT CAG ATA CCG TCG TA-3' R: 5'-TGA GGT TTC CCG TGT TGA GT-3'
	7S RNA (light-strand promoter transcript)	F: 5'-GGT AGA GGC GAC AAA CCT ACC G-3' R: 5'-TTT AGG CCT ACT ATG GGT GT-3'
	16S rRNA (frist heavy-strand promoter transcript)	F: 5'-GGC CAA CCT CCT ACT CC-3' R: 5'-GAT GGT AGA TGT GGC GGG TT-3'
	ND1 mRNA (distal heavy-strand promoter transcript)	F: 5'-AGC CAC TTT CCA CAC AGA CAT C-3' R: 5'-GTT AGG CTG GTG TTA GGG TTC T-3'

于37 °C孵育20 min。TD缓冲液清洗细胞3次后胰酶消化, 收集细胞于1.7 mL EP管中, 25 °C、500 ×g离心5 min。TD缓冲液清洗细胞1次后, 加入430 μL TD缓冲液重悬细胞。细胞悬液按100 μL/孔的量加入到96孔黑色荧光板中, 用多功能酶标仪检测激发/发射波长为543/580 nm处的荧光强度。测定得到的数值经蛋白质浓度校正后得到各样本相对荧光强度值。

1.7 细胞ROS的检测

分别收集mtDNA单体型M8a和G2a的转线粒体细胞, TD洗涤后用200 μL DMEM重悬细胞。加入200 μL新鲜配制的1 mmol/L MitoSOX储存液(50 μg MitoSOX Red溶于65 μL DMSO)和DMEM培养液(1:100)混合液, 于37 °C避光孵育20 min。Hank's缓冲盐溶液洗涤细胞3次, 加入430 μL HBSS重悬细胞。细胞悬液按100 μL/孔的量加入到96孔黑色荧光板中, 用多功能酶标仪检测激发/发射波长为510/580 nm处的荧光强度。测定得到的数值经蛋白质浓度校正后得到各样本相对荧光强度值。

1.8 数据统计

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 计量资料采用Independent-samples *t*检验进行数据分析, 各参数以均数±标准差(mean±S.D.)表示, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果

2.1 转线粒体细胞单体型鉴定

成功构建转线粒体细胞后, 我们通过mtDNA全序列测定, 并参考文献[17]以及PhyloTree.org mtDNA

tree Built 17(18 Feb 2016)对转线粒体细胞进行单体型鉴定, 证实构建的转线粒体细胞确为mtDNA单体型M8a和G2a(表2)。

2.2 转线粒体细胞mtDNA拷贝数和转录水平的检测

Real-time PCR结果显示, 与mtDNA单体型G2a转线粒体细胞相比, 单体型M8a转线粒体细胞的mtDNA拷贝数和转录水平均发生改变(图1)。其中, mtDNA拷贝数和代表线粒体DNA轻链(7S RNA)转录水平的下降在2组间具有极显著差异($P < 0.01$)。

2.4 细胞内源性氧呼吸和MMP的检测

根据检测结果我们发现, 与mtDNA单体型G2a相比, 单体型M8a转线粒体细胞表现为基础耗氧量、ATP合成耗氧量和最大氧呼吸能力下降的情况(图2), 且3者的变化在2组间具有显著性差异($P < 0.05$)。同时, MMP检测结果也表明, 单体型M8a转线粒体细胞MMP显著下降(图3)。

2.5 细胞ROS水平

细胞ROS检测结果显示, 单体型M8a转线粒体细胞比G2a细胞具有更高的ROS水平, 且在两组间比较具有显著差异(图4, $P < 0.05$)。

3 讨论

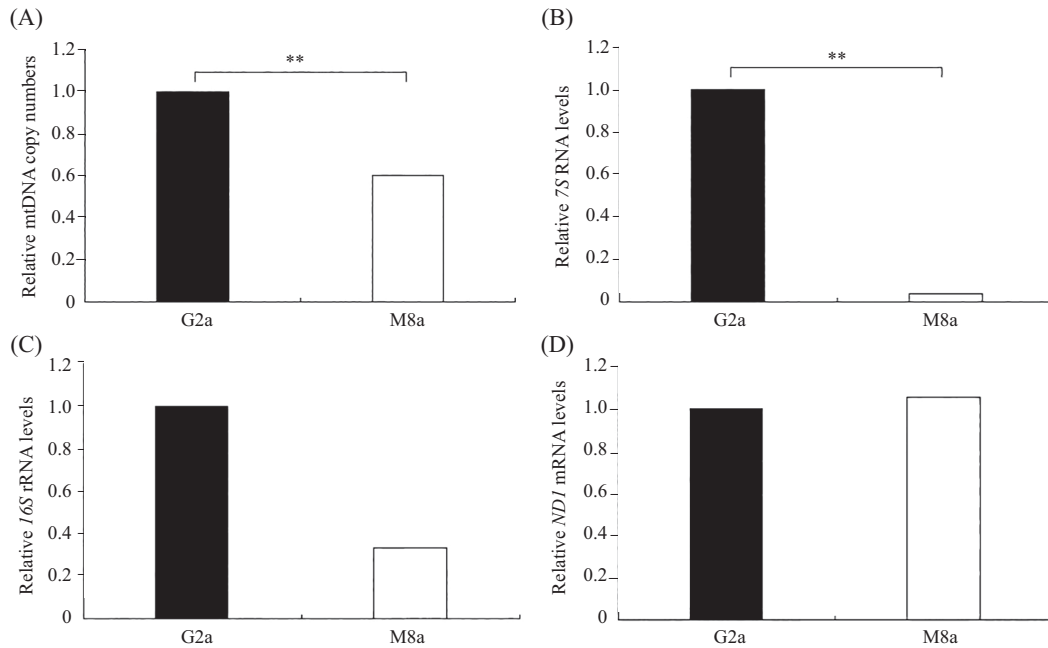
线粒体是细胞呼吸和能量代谢的中心, 细胞生长代谢所需的大部分ATP都是通过线粒体氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)产生的。mtDNA编码了OXPHOS系统重要组分的13个多肽, 和参与线粒体转录翻译的2个rRNA和22个

表2 mtDNA单体型M8a和G2a转线粒体细胞的mtDNA变异位点

Table 2 mtDNA variants in transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroups M8a and G2a						
基因	位点	碱基改变	剑桥参考序列	单体型M8a	单体型G2a	
Gene	Position	Nucleotide change	CRS	Haplogroup M8a	Haplogroup G2a	
<i>D-loop</i>	73	A to G	A	G	G	
	188	A to G	A	A	G	
	257	A to G	A	G	A	
	263	A to G	A	G	G	
	310	T to C	T	T	C	
	489	T to C	T	C	C	
	16 129	G to A	G	A	G	
	16 184	C to T	C	T	C	
	16 189	T to C	T	C	T	
	16 209	T to C	T	C	T	
	16 223	C to T	C	T	T	
	16 227	A to G	A	A	G	
	16 278	C to T	C	T	T	
	16 293	A to G	A	A	C	
	16 298	T to C	T	C	T	
	16 319	G to A	G	A	G	
	16 362 ^b	T to C	T	T	C	
	16 470	G to A	G	A	G	
	16 471	G to A	G	A	G	
	16 473	G to A	G	A	G	
	16 476	A to G	A	G	A	
	<i>12S rRNA</i>	709 ^b	G to A	G	G	A
		750	A to G	A	G	G
1 438		A to G	A	G	G	
<i>16S rRNA</i>	2 706	A to G	A	G	G	
	2 835	C to T	C	T	C	
<i>ND2</i>	4 715	A to G	A	G	A	
	4 769	A to G	A	G	G	
	4 833 ^b	A to G (Thr to Ala)	A	A	G	
	5 108 ^b	T to C	T	T	C	
<i>tRNA^{Ala}</i>	5 601 ^b	C to T	C	C	T	
<i>COI</i>	6 179 ^a	G to A	G	A	G	
	7 028	C to T	C	T	T	
	7 196 ^a	C to A	C	A	C	
<i>COII</i>	7 600	G to A	G	G	A	
	8 584 ^a	G to A (Ala to Thr)	G	A	G	
<i>ATPase6</i>	8 684 ^a	C to T (Thr to Ile)	C	T	C	
	8 701	A to G (Thr to Ala)	A	G	G	
	8 860	A to G (Thr to Ala)	A	G	G	
	<i>COIII</i>	9 377	A to G	A	A	G
9 540		T to C	T	C	C	
9 575		G to A	G	G	A	
<i>ND3</i>	10 398	A to G (Thr to Ala)	A	G	G	
	10 400	C to T (Thr to Ala)	C	T	T	
<i>ND4</i>	10 873	T to C	T	C	C	
	11 176	G to A	G	A	G	
	11 719	G to A	G	A	A	
<i>ND5</i>	12 705	C to T	C	T	T	
	13 563 ^b	A to G	A	A	G	
<i>ND6</i>	14 200	T to C	T	T	C	
	14 341	C to T	C	C	T	
	14 470	T to C	T	C	T	
	14 569 ^b	G to A	G	G	A	
<i>Cyt b</i>	14 766	C to T (Ile to Thr)	C	T	T	
	14 783	T to C	T	C	C	
	15 043	G to A	G	A	A	
	15 301	G to A	G	A	A	
	15 326	A to G (Thr to Ala)	A	G	G	
	15 487 ^a	A to T	A	T	A	

CRS: 剑桥参考序列; a: 定义mtDNA单体型M8a的SNP位点; b: 定义mtDNA单体型G2a的SNP位点。

CRS: Cambridge reference sequence; a: polymorphic site defining haplogroup M8a; b: polymorphic site defining haplogroup G2a.

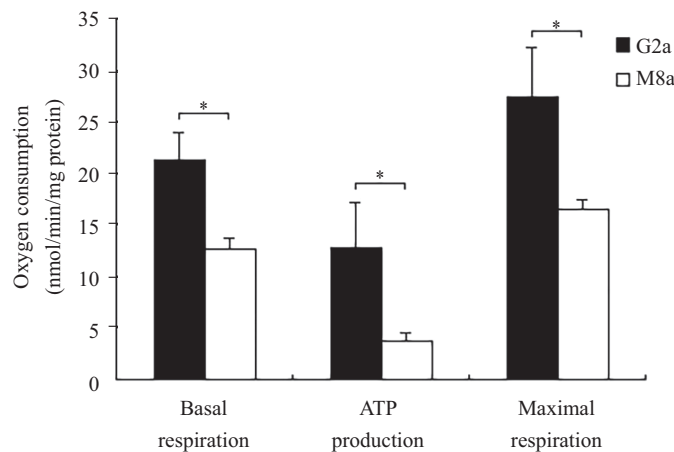


A: 细胞mtDNA拷贝数分析结果; B: 细胞7S rRNA水平分析结果; C: 细胞16S rRNA水平分析结果; D: 细胞NDI mRNA水平分析结果。M8a: mtDNA单体型M8a转线粒体细胞; G2a: mtDNA单体型G2a转线粒体细胞。** $P < 0.01$ 。

A: copy numbers of mtDNA in transmitochondrial cybrids; B: mitochondrial 7S rRNA level in transmitochondrial cybrids; C: mitochondrial 16S rRNA level in transmitochondrial cybrids; D: mitochondrial NDI mRNA level in transmitochondrial cybrids. M8a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup M8a; G2a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup G2a. ** $P < 0.01$.

图1 细胞mtDNA拷贝数和转录水平分析结果图

Fig.1 The analyses of mtDNA copy numbers and transcriptional levels



M8a: mtDNA单体型M8a转线粒体细胞; G2a: mtDNA单体型G2a转线粒体细胞。* $P < 0.05$ 。

M8a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup M8a; G2a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup G2a. * $P < 0.05$.

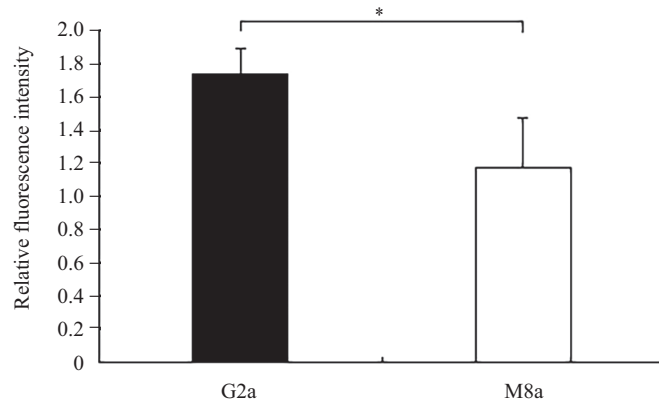
图2 细胞线粒体氧呼吸分析结果

Fig.2 The analyses of mitochondrial respiration

tRNA。以转线粒体细胞为基础的研究证实, 线粒体tRNA^{Leu(UUR)} 3243A>G突变能够引起mtDNA转录和翻译、ATP生成、钙离子稳态、哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路等的改变; 线粒体tRNA^{Gly} 10003T>C突变则对细胞tRNA^{Gly}转录、细胞ROS和MMP水平等产生了影响; 线粒体ND5 12955A>G突变则能够影响细胞

OXPHOS相关ATP的生成、细胞外乳酸水平和线粒体ROS水平等^[7,18-19]。

作为定义mtDNA单型的SNP位点, 他们经过数千年的选择和积累, 部分SNP的形成可能引起氨基酸和功能性的改变, 还有部分则可能引起mtDNA复制和转录效率的改变。这些SNP位点能够引起细胞ATP和ROS水平的改变, 并通过参与调控信号通

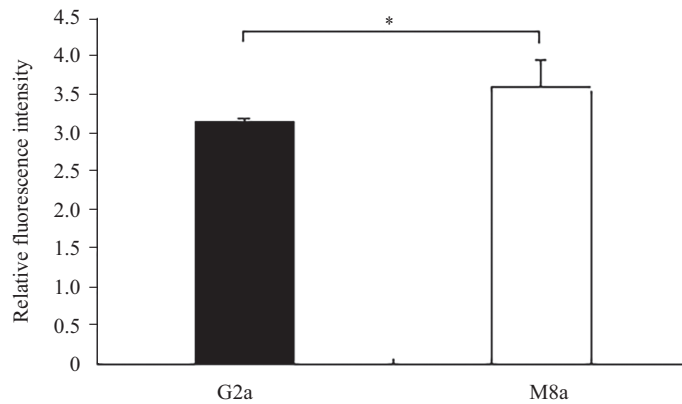


M8a: mtDNA单体型M8a转线粒体细胞; G2a: mtDNA单体型G2a转线粒体细胞。* $P < 0.05$ 。

M8a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup M8a; G2a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup G2a. * $P < 0.05$ 。

图3 细胞MMP分析结果

Fig.3 The analyses of MMP



M8a: mtDNA单体型M8a转线粒体细胞; G2a: mtDNA单体型G2a转线粒体细胞。* $P < 0.05$ 。

M8a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup M8a; G2a: transmitochondrial cybrids from mtDNA haplogroup G2a. * $P < 0.05$ 。

图4 细胞ROS水平分析结果

Fig.4 The analyses of ROS production

路来影响细胞表型的变化。有研究表明, mtDNA单体型可能对疾病的表型和严重程度具有一定的作用^[20-21]。研究者推测, 特定的mtDNA单体型可能引起与疾病相关的免疫信号通路中的基因表达的改变, 相较于其他mtDNA单体型而言, 该单体型对于核基因表达模式和外界环境的应答方式具有其特定的途径。近年来, 越来越多的研究利用转线粒体细胞技术平台, 将定义不同mtDNA单体型的外源线粒体导入 ρ^0 143B细胞来研究其与线粒体疾病的关系。他们认为, 除核基因和环境因素外, mtDNA单体型也能够对疾病相关的信号通路中的核基因表达产生重要影响^[22]。在前期线粒体基因筛查和流行病学研究中我们发现, mtDNA单体型M8a和G2a分别为T2DM发病的风险因子和保护因素。本研究同样采用 ρ^0 143B细胞, 分别构建mtDNA单体型M8a和G2a

转线粒体细胞, 在统一核背景下探讨mtDNA单体型对细胞线粒体功能上的影响。

本文通过Real-time PCR检测mtDNA拷贝数和转录水平, 发现与mtDNA单体型G2a转线粒体细胞相比, M8a转线粒体细胞表现为mtDNA拷贝数和L链转录水平显著下降($P < 0.05$)。除此之外, 本研究还通过测定细胞内源性氧呼吸、MMP和ROS水平等方面对转线粒体细胞线粒体功能进行比较。在结果中, 我们发现, 相较于mtDNA单体型G2a, M8a转线粒体细胞表现为细胞基础耗氧量、ATP合成耗氧量和最大氧呼吸能力显著下降($P < 0.05$), MMP显著下降($P < 0.05$), 细胞ROS水平显著上升($P < 0.05$)的现象。氧化应激是引起T2DM发生的重要因素, 线粒体电子传递链是产生ROS的主要途径^[23]。线粒体呼吸功能障碍, 引起氧自由基代谢紊乱, 细胞氧化应激水平

升高。多项研究表明, 氧化应激可以直接损伤 β 细胞线粒体结构, 也可通过影响核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、cJun氨基末端激酶-促分裂素原活化蛋白激酶(cJun N-terminal kinase-mitogen-activated protein kinase, JNK-MAPK)等信号通路间接抑制 β 细胞功能, 减少胰岛素的合成和分泌^[24-25]; 另一方面, 氧化应激可以通过干扰胰岛素受体(insulin receptor, InsR)和胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)的磷酸化反应, 还可激活参与胰岛素信号转导的丝氨酸/苏氨酸激酶, 包括蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、mTOR和糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)等, 导致胰岛素信号转导受阻, 发生胰岛素抵抗^[26-27]。结合本实验结果, 我们推测, mtDNA单体型M8a可能通过降低mtDNA拷贝数和转录水平引起细胞基础耗氧量、ATP合成耗氧量、最大氧呼吸能力和MMP的下降, 细胞ROS水平升高, 表现出线粒体呼吸功能受损, 引起机体氧化应激增加, 从而提高了T2DM的患病风险。

综上所述, 本研究通过构建转线粒体细胞并对mtDNA单体型M8a和G2a进行了mtDNA拷贝数、转录水平以及线粒体功能进行比较分析, 发现mtDNA单体型M8a细胞表现为mtDNA拷贝数和L链转录水平显著下降, 细胞基础耗氧量、ATP合成耗氧量和最大氧呼吸能力显著下降, MMP显著下降, 线粒体呼吸功能受损, 细胞ROS水平显著上升, 提示mtDNA单体型M8a人群比G2a人群具有更高的罹患T2DM的风险。

参考文献 (References)

- Lu J, Sharma LK, Bai Y. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Res* 2009; 19(7): 802-15.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; 13(12): 878-90.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(10): 685-98.
- Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, *et al.* Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet* 2006; 2(8): e128.
- Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, *et al.* Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17(24): 4001-11.
- Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, *et al.* Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet* 2009; 5(5): e1000474.
- Fang H, Shi H, Li X, Sun D, Li F, Li B, *et al.* Exercise intolerance and developmental delay associated with a novel mitochondrial ND5 mutation. *Sci Rep* 2015; 5: 10480.
- 李凤杰, 沈丽君, 方合志, 白益东. 线粒体呼吸链复合体I. *中国细胞生物学学报*(Li Fengjie, Shen Lijun, Fang Hezhi, Bai Yidong. Mitochondrial respiratory complex I. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(8): 1153-61.
- Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmic conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(11): a021220.
- Feng J, Zhang J, Liu M, Wan G, Qi K, Zheng C, *et al.* Association of mtDNA haplogroup F with healthy longevity in the female Chuang population, China. *Exp Gerontol* 2011; 46(12): 987-93.
- Weng SW, Kuo HM, Chuang JH, Lin TK, Huang HL, Lin HY, *et al.* Study of insulin resistance in cybrid cells harboring diabetes-susceptible and diabetes-protective mitochondrial haplogroups. *Mitochondrion* 2013; 13(6): 888-97.
- Bi R, Zhang W, Yu D, Li X, Wang HZ, Hu QX, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup B5 confers genetic susceptibility to Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurobiol Aging* 2015; 36(3): 1604.e7-16.
- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, *et al.* Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(8): 1216-22.
- Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox Biol* 2014; 2: 619-31.
- Mohlke KL, Jackson AU, Scott LJ, Peck EC, Suh YD, Chines PS, *et al.* Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum Genet* 2005; 118(2): 245-54.
- Fang H, Liu X, Shen L, Li F, Liu Y, Chi H, *et al.* Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. *Int J Mol Sci* 2014; 15(2): 2646-59.
- Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, *et al.* Updating the East Asian mtDNA phylogeny: A prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet* 2006; 15(13): 2076-86.
- Picard M, Zhang J, Hancock S, Derbeneva O, Golhar R, Golik P, *et al.* Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmity causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(38): E4033-42.
- Li W, Wen C, Li W, Wang H, Guan X, Zhang W, *et al.* The tRNA (Gly) T10003C mutation in mitochondrial haplogroup M11b in a Chinese family with diabetes decreases the steady-state level of tRNA (Gly), increases aberrant reactive oxygen species production, and reduces mitochondrial membrane potential. *Mol Cell Biochem* 2015; 408(1/2): 171-9.
- Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, *et al.* Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007; 81(2): 228-33.
- Strauss KA, DuBiner L, Simon M, Zaragoza M, Sengupta PP, Li P, *et al.* Severity of cardiomyopathy associated with adenine

- nucleotide translocator-1 deficiency correlates with mtDNA haplogroup. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9): 3453-8.
- 22 Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, *et al.* Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: Implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(2): 208-19.
- 23 Fardoun RZ. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Hypertens* 2007; 29(3): 135-48.
- 24 Hayden MR, Sowers JR. Isletopathy in Type 2 diabetes mellitus: Implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 891-910.
- 25 Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 2010; 460(4): 703-18.
- 26 Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 993-9.
- 27 Jeong EM, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, *et al.* Role of mitochondrial oxidative stress in glucose tolerance, insulin resistance, and cardiac diastolic dysfunction. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(5): e003046.