

mtDNA单倍型D4和B4a细胞线粒体功能及其影响衰老发生的机制研究

周超^{1,2} 高静¹ 熊静霆¹ 仇如意¹ 沈丽君¹ 吕建新^{1,3*}

(¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, Attardi线粒体生物医学研究院, 温州 325035; ²浙江大学医学院附属儿童医院, 杭州 310003; ³杭州医学院, 杭州 310053)

摘要 该文初步分析了两个与衰老发生抑制及促进的线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)单倍型D4和B4a细胞的线粒体功能情况, 并对其影响衰老的可能机制进行了探究。通过细胞融合构建两个核背景一致但mtDNA单倍型分别是D4和B4a的胞质杂合细胞。应用RT-PCR方法检测细胞mtDNA拷贝数以及线粒体基因的mRNA水平, 氧电极法和非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(blue native polyacrylamide gelelectrophoresis, BN-PAGE)技术检测细胞线粒体氧化呼吸能力及线粒体复合体水平, TMRM染料和DCFH-DA染料法检测细胞线粒体膜电位和活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成水平。结果显示, D4单倍型细胞线粒体氧化呼吸能力、膜电位水平以及线粒体基因(mt-ND1、mt-7S RNA)转录水平均明显高于B4a单倍型细胞, 而ROS生成水平明显降低, mtDNA拷贝数则并无明显差异。该结果表明, 在D4单倍型细胞中, 通过提高某些线粒体基因的表达, 使得线粒体呼吸复合体表达得到提升, 继而提高线粒体氧化呼吸功能, 降低细胞氧化损伤, 从而延缓衰老的发生。

关键词 线粒体DNA单倍型; 线粒体功能; 氧化损伤; 衰老

A Study of the Mitochondrial Function of mtDNA Haplogroup D4 and B4a Cells and the Mechanism of These Haplogroups Effects on the Occurrence of Aging

Zhou Chao^{1,2}, Gao Jing¹, Xiong Jingting¹, Qiu Ruyi¹, Shen Lijun¹, Lü Jianxin^{1,3*}

(¹Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; ³Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract The aim of this study was to analysis the mitochondrial function in mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroup D4 and B4a cell lines and to investigate the possible mechanism of aging. Haplogroup D4 was found to be significantly related to resistance to aging and haplogroup B4a was found to be a risk factor for aging. The mtDNA haplogroup D4 and B4a transmitochondrial cybrids with the same nuclear background were obtained bycytoplasmic hybrid. RT-PCR, clark electrode and gradient blue native polyacrylamide gelelectrophoresis (BN-PAGE), TMRM and DCFH-DA detained, were carried out to examine mtDNA content and mtDNA transcription level, the oxygen consumption rate and mitochondrial complex expression, the mitochondrial membrane potential

收稿日期: 2016-12-06 接受日期: 2017-04-07

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: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

Received: December 6, 2016 Accepted: April 7, 2017

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

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2017-05-24 17:46:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170524.1746.010.html>

and reactive oxygen species (ROS) generation, in those cells. Results showed that the mitochondrial oxygen consumption rate, mitochondrial membrane potential and mtDNA (*ND1*, *7S* RNA) transcription level of haplogroup D4 cybrids cell were significantly higher than those of haplogroup B4a cybrids cell, but ROS generation level was significantly lower than that of haplogroup B4a cybrids cell, although there are no significant on mtDNA content level between the two cells. In addition, the mitochondrial function was improved and oxidative damage was decreased in haplogroup D4 cybrids cell by promoting the expression of mtDNA and mitochondrial respiratory complex, so as to delay the occurrence of aging.

Keywords mitochondrial DNA haplogroup; mitochondrial function; oxidative damage; aging

人类线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)单倍型指的是一组在进化过程中连锁遗传的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)^[1],反映了在离散的母系遗传家系中mtDNA变异的累积^[2]。由于mtDNA编码了部分氧化磷酸化复合体,因此,mtDNA单倍型差异势必会影响线粒体的部分功能,进而影响特定mtDNA单倍型人群的疾病易感性^[3]。已有报道认为,mtDNA单倍型与多种退行性疾病的发生密切相关,如N9a单倍型的日本人群是代谢综合征发生的保护因素;T单倍型是意大利南方人群肥胖发生的危险因素^[4-5]。

衰老是一个复杂的、受多因素影响的生理过程,而氧自由基升高导致的氧化损伤被认为是衰老发生的主要原因^[6-7]。线粒体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞内氧自由基的主要来源。已有证据表明,线粒体质量和活性的下降与正常衰老及年龄相关疾病的发生直接相关^[8-9],其中ROS上升提示线粒体质量和活性下降,是个体衰老的重要原因。

目前,已有部分mtDNA单倍型被报道与衰老发生有关,例如意大利北方人群中的单倍型J人群和日本男性人群中的单倍型D4以及D5被视为长寿保护因子^[10]。此外,单倍型M9、N9以及B4a在中国人群中与衰老正相关,而单倍型D4则与衰老负相关^[11]。尽管衰老与mtDNA单倍型的关系已经有上述多项研究确认,然而mtDNA单倍型在个体衰老过程中的具体作用机制尚未得到阐述。为了进一步明确mtDNA单倍型影响个体衰老的内在分子机制。我们拟以单倍型D4和B4a为对象,研究作为抑制或促进衰老发生的两个线粒体单倍型影响衰老的内在机制。为此,我们首先建立了两个核背景一致、但分别具有线粒体单倍型D4和B4a遗传背景的胞质杂合体细胞,随后对这两种单倍型细胞模型的线粒体功能进行分析,从而探究mtDNA单倍型通过影响线粒体功能影

响细胞或者个体衰老的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基购自Hyclone公司和新生牛血清(newborn calfserum, NCS)购自Sigma公司。青霉素-链霉素液购自上海碧云天生物技术有限公司。胰蛋白酶消化液、活性氧检测试剂盒DCFH-DA、膜电位检测试剂盒TMRM均购自Thermo Fisher Scientific公司。线粒体基因拷贝引物和mt-*ND1*、mt-*7S* RNA、mt-*16S* rRNA引物均合成。逆转录试剂盒购自TaKaRa公司。寡霉素和FCCP购自Sigma公司。细胞融合用的血小板收集于健康成人全血。

1.2 细胞培养

去mtDNA的143B细胞(rho zero细胞)以及单倍型D4和B4a细胞用含10% NCS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100 μg/mL)的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。按照细胞融合的标准操作将143Bp0细胞和健康成人血小板进行融合,并用选择培养基(含尿嘧啶不含丙酮酸盐的DMEM培养基)筛选融合细胞^[12-13]。

1.3 mtDNA拷贝数检测

将细胞培养于6孔板中,生长至80%时胰蛋白酶消化后获取约 1×10^6 细胞沉淀,细胞沉淀用PBS淋洗1次。采用SDS裂解法手工法提取细胞总DNA,然后利用FastStart Universal SYBR Green Master(Roche公司)试剂盒进行荧光定量PCR(Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR),以*ND2*作为线粒体拷贝数检测的目的基因,以*18S* rRNA作为内参,每组实验重复3次。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达水平。RT-PCR引物信息见表1。

1.4 荧光定量PCR(RT-PCR)检测

用Trizol(Invitrogen公司)裂解细胞提取总RNA。

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of RT-PCR Primers

目的基因	引物序列
Target genes	Primer sequences
Human mtDNA	F: 5'-CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT-3' R: 5'-TGG CCA TGG GTA TGT TGT TAA-3'
Human nDNA (18S rRNA)	F: 5'-TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC-3' R: 5'-CGC TGA GCC AGT CAG TGT-3'
mt-ND1	F: 5'-GGC CAA CCT CCT ACT CC-3' R: 5'-GAT GGT AGA TGT GGC GGG TT-3'
mt-7S RNA	F: 5'-AGC CAC TTT CCA CAC AGA CAT C-3' R: 5'-GTT AGG CTG GTG TTA GGG TTC T-3'
mt-16S rRNA	F: 5'-GGT AGA GGC GAC AAA CCT ACC G-3' R: 5'-TTT AGG CCT ACT ATG GGT GT-3'

利用逆转录试剂盒(TaKaRa公司)将RNA逆转录成cDNA,然后利用FastStart Universal SYBR Green Master(Roche公司)试剂盒进行RT-PCR,以18S rRNA作为内参检测目的基因ND1、mt-7S RNA、16S rRNA,每组实验重复3次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。RT-PCR引物信息见表1。

1.5 线粒体复合体含量检测

利用Triton X-100(Sigma公司)处理细胞,提取线粒体复合体蛋白质,通过非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(Blue Native-PAGE)对线粒体复合体蛋白质进行检测^[14],免疫印迹所用抗体为抗-NDUFA13抗体(Grim19)(1:1 000, Abcam公司)、抗-SDHA抗体(1:2 000, Abcam公司)、抗-UQCRC2抗体(1:1 000, Abcam公司)、抗-COXI抗体(1:1 000, Abcam公司)和抗-ATP5A抗体(1:2 000, Abcam公司)。

1.6 细胞氧耗量检测实验

将细胞接种于60 mm培养皿中,待细胞长至70%~80%,胰蛋白酶消化细胞后重悬细胞并计数约 1×10^6 细胞,使用O2K线粒体功能检测仪(Oroboros公司)对细胞氧耗量进行检测。

1.7 线粒体膜电位检测

将细胞培养在6孔板中,待细胞长至约80%汇合度时,加入30 nmol/L TMRM,于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养20 min。PBS淋洗细胞3次,胰蛋白酶消化细胞并收集沉淀,25 °C,500 ×g离心3 min。430 μL PBS重悬细胞并按每孔100 μL的量加到96孔荧光板中,每个待测样本4个复孔,使用多功能酶标仪在Ex/Em=(540/575) nm波长下检测荧光值,剩余

细胞悬液用于细胞浓度测定或细胞计数校正。

1.8 活性氧生成检测

将细胞种于60 mm培养皿中,待细胞生长至80%密度时,用胰蛋白酶消化收集细胞,25 °C、500 ×g离心3 min,弃上清,37 °C预热的PBS重悬淋洗细胞1遍。同样条件离心,留沉淀。加入400 μL含10 μmol/L DCFH-DA的无血清DMEM重悬,37 °C细胞培养箱孵育20 min,收集沉淀用HBSS液淋洗细胞3次,用430 μL HBSS液重悬细胞并按每孔100 μL的量加到96孔荧光板中,每个待测样本4个复孔,使用多功能酶标仪在Ex/Em=(540/575) nm波长下检测荧光值,剩余细胞悬液用于细胞浓度测定或细胞计数校正。

1.9 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。数据运用mean±S.D.表示,两样本间均数的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建并获得单倍型D4和B4a融合细胞

为了避免核遗传背景对mtDNA单倍型功能研究的干扰作用,我们建立了两个核背景一致但mtDNA单倍型,分别是D4和B4a的胞质杂合细胞。首先,我们提取了mtDNA单倍型分别是D4和B4a的健康人的血小板,并将其与去mtDNA的143B细胞(rho zero细胞)进行融合,为排除潜在的致病性突变位点对mtDNA单倍型功能分析的影响,进行了mtDNA单倍型全序测定。表2和表3分别为D4j、B4a2b1单倍型细胞测序结果,我们并未在两个mtDNA单倍型中发现未报道的或已报

表2 单倍型D4j细胞测序结果
Table 2 Results of sequencing of haplogroup D4j cell

位点 Position	基因 Gene	碱基序列 rCRS base	突变碱基 Mutation	氨基酸改变 AA change	数据库 mtDNA database
73	D-loop	A	G	No	Polymorphic site
263	D-loop	A	G	No	Polymorphic site
489	D-loop	T	C	No	Polymorphic site
750	<i>12S</i> rRNA	A	G	No	Polymorphic site
1 438	<i>12S</i> rRNA	A	G	No	Polymorphic site
2 706	<i>16S</i> rRNA	A	G	No	Polymorphic site
3 010	<i>16S</i> rRNA	G	A	No	Polymorphic site
4 769	ND2	A	G	No	Polymorphic site
4 883	ND2	C	T	No	Polymorphic site
5 178	ND2	C	A	No	Polymorphic site
7 028	COI	C	T	No	Polymorphic site
8 414	ATPase8	C	T	Leu→Phe	Polymorphic site
8 701	ATPase6	A	G	Thr→Ala	Polymorphic site
8 860	ATPase6	A	G	Thr→Ala	Polymorphic site
9 540	COIII	T	C	No	Polymorphic site
10 398	ND3	A	G	No	Polymorphic site
10 400	ND3	C	T	Thr→Ala	Polymorphic site
10 410	tRNAArg	T	C	No	Polymorphic site
10 819	ND4	A	G	No	Polymorphic site
10 873	ND4	T	C	No	Polymorphic site
11 696	ND4	G	A	Val→Ile	Polymorphic site
11 719	ND4	G	A	No	Polymorphic site
12 705	ND5	C	T	No	Polymorphic site
14 668	ND6	C	T	No	Polymorphic site
14 766	Cytb	C	T	Ile→Thr	Polymorphic site
14 783	Cytb	T	C	No	Polymorphic site
15 043	Cytb	G	A	No	Polymorphic site
15 301	Cytb	G	A	No	Polymorphic site
15 326	Cytb	A	G	Thr→Ala	Polymorphic site
16 172	D-loop	T	C	No	Polymorphic site
16 223	D-loop	C	T	No	Polymorphic site
16 319	D-loop	G	A	No	Polymorphic site
16 327	D-loop	C	T	No	Polymorphic site
16 362	D-loop	T	C	No	Polymorphic site

道致病的变异位点。因此,我们选用该两株单倍型细胞(D4j和B4a2b1)作为D4和B4a单倍型细胞功能研究模型,在本文中以D4细胞和B4a细胞表示。

2.2 单倍型D4和B4a细胞mtDNA拷贝数比较

为了探究D4和B4a单倍型是否直接通过线粒体

基因拷贝数影响衰老发生,我们利用荧光定量PCR方法对mtDNA拷贝数进行检测。结果显示,在D4a和B4a单倍型两株细胞中mtDNA拷贝数并无差异,表明D4和B4a单倍型影响衰老的差异与mtDNA拷贝数水平无直接关系(图1)。

表3 单倍型B4a2b1细胞测序结果

Table 3 Results of Sequencing of haplogroup B4a2b1 cell

位点 Position	基因 Gene	碱基序列 rCRS base	突变碱基 Mutation	氨基酸改变 AA change	数据库 mtDNA database
73	D-loop	A	G	No	Polymorphic site
263	D-loop	A	G	No	Polymorphic site
310	D-loop	T	C	No	Polymorphic site
750	12S rRNA	A	G	No	Polymorphic site
1 438	12S rRNA	A	G	No	Polymorphic site
2 706	16S rRNA	A	G	No	Polymorphic site
4 769	ND2	A	G	No	Polymorphic site
4 935	ND2	A	G	Thr→Ala	No
5 465	ND2	T	C	No	Polymorphic site
6 620	COI	T	C	No	Polymorphic site
7 028	COI	C	T	No	Polymorphic site
7 379	COI	G	A	No	No
8 216	COII	C	T	No	No
8 860	ATPase6	A	G	Thr→Ala	Polymorphic site
9 123	ATPase6	G	A	No	Polymorphic site
9 812	COIII	C	T	No	Polymorphic site
10 876	ND4	A	G	No	Polymorphic site
11 719	ND4	G	A	No	Polymorphic site
12 190	tRNA His	A	G	No (T-loop)	No
14 766	Cytb	C	T	Ile→Thr	Polymorphic site
15 326	Cytb	A	G	Thr→Ala	Polymorphic site
16 182	D-loop	A	C	No	Polymorphic site
16 183	D-loop	A	C	No	Polymorphic site
16 189	D-loop	T	C	No	Polymorphic site
16 261	D-loop	C	T	No	Polymorphic site
16 360	D-loop	C	T	No	Polymorphic site
16 519	D-loop	A	G	No	Polymorphic site
8 281-8 289			Deletions		

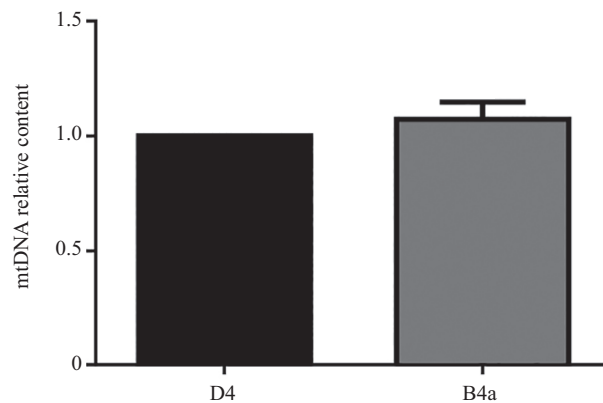


图1 单倍型D4和B4a细胞mtDNA拷贝数检测

Fig.1 Analysis of mitochondrial DNA content

2.3 单倍型D4和B4a细胞mtDNA转录水平比较

D4和B4a单倍型细胞mtDNA拷贝数与衰老无直接相关。因此,我们对单倍型D4和B4a两株细胞线粒体生物合成能力(mitochondrial biogenesis)进行检测。采用荧光定量PCR方法对相关线粒体基因转录水平(mt-*ND1*、mt-7S RNA、mt-16S rRNA)进行检测。结果显示,在两株细胞中mt-16S rRNA转录水平无明显差异(图2A),而mt-*ND1*和mt-7S RNA转录水平在单倍型B4a细胞中较低,且具有统计学差异(图2B和图2C)。此结果说明,单倍型D4细胞通过提升某些特定线粒体基因的转录水平,发挥延缓衰老作用。

2.4 单倍型D4和B4a细胞氧耗量的检测

为进一步分析D4和B4a单倍型对于衰老的不同影响,因D4细胞mt-*ND1*和mt-7S RNA的转录水平较高于B4a,为此,我们分析了单倍型D4和B4a细胞线粒体功能情况,我们首先对两株细胞氧耗量(oxygen consumption rate, OCR)进行检测。结果显示,单倍型D4细胞较B4a细胞的基础氧耗量(basal OCR)高约50%,经寡霉素(oligomycin)处理后, D4细胞仍较B4a细胞氧耗量高,并且其最大线粒体氧耗量(FCCP处理)也较B4a细胞高,统计学具有差异(图3A)。同时,检测到单倍型D4细胞线粒体依赖的氧耗量(baseline-oligomycin)较B4a细胞高,然而最大线粒体

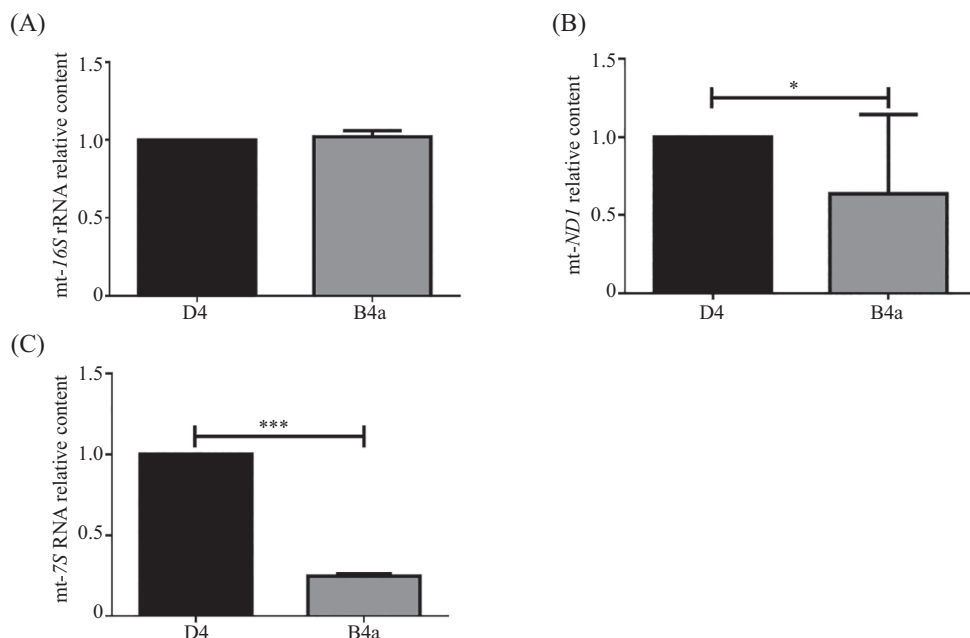
氧耗量与基础氧耗量比值(FCCP/baseline)在两株细胞间并没有差异(图3B)。以上结果表明,在相同核基因背景下,单倍型D4细胞的线粒体氧化呼吸能力明显高于B4a细胞,且具有统计学差异。

2.5 单倍型D4和B4a细胞线粒体复合体水平比较

为进一步明确D4和B4a细胞间导致线粒体呼吸功能差异的原因,同时也可间接反映mtDNA编码基因表达水平,我们对细胞线粒体呼吸复合体单体表达水平进行检测(图4A)。结果发现,在单倍型B4a细胞中其复合体I、III单体的表达量较D4单倍型细胞为低,以复合体II作为校正(图4B)。此结果表明,单倍型D4和B4a单倍型细胞线粒体复合体I、III表达水平的差异导致线粒体呼吸功能的差异。

2.6 单倍型D4和B4a线粒体膜电位比较

线粒体膜电位和线粒体内外膜间质子梯度是驱动质子回流线粒体基质中的两大动力^[6]。为进一步反映单倍型D4和B4a细胞线粒体氧化呼吸能力,我们通过阳离子染料TMRM对两株细胞进行染色并检测荧光强度,结果显示,单倍型D4细胞线粒体膜电位显著高于B4a细胞,统计学具有差异(图5)。由于单倍型D4和B4a在一部分人群中分别表现为保护因素和危险因素,因此,以上结果提示,线粒体氧化呼吸功能的降低与衰老的发生存在关联。

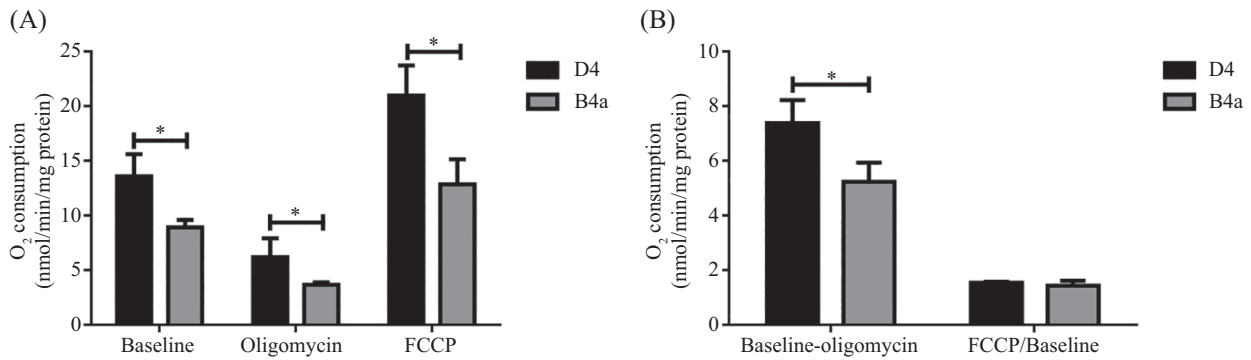


A~C: RT-PCR分别检测线粒体基因*ND1*、7S RNA、16S rRNA mRNA水平; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A~C: mRNA levels of *ND1*, 16S rRNA, 16S rRNA were detected by RT-PCR; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图2 单倍型D4和B4a细胞*ND1*、mt-7S RNA、16S rRNA基因转录水平检测

Fig.2 Analysis of the transcription of *ND1*, mt-7S RNA and 16S rRNA in haplogroup D4 and B4a cells

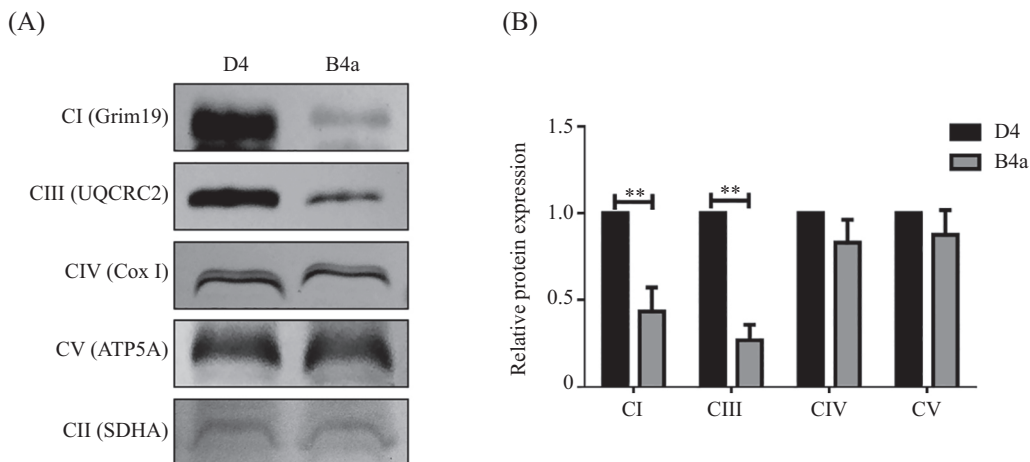


A: 单倍型D4和B4a细胞基础氧耗量值和加入Oligomycin(0.01 mg/mL)处理后的氧耗量值, 随后加入FCCP(0.1 mmol/L)处理后的最大氧耗量值; B: 线粒体依赖的氧耗量值(baseline-oligomycin)和最大线粒体氧耗量与基础氧耗量比值。* $P < 0.05$ 。

A: the haplogroup D4 and B4a cells of basal oxygen consumption rate were measured and cells were treated with oligomycin (0.01 mg/mL) to determine the status of respiration, then cells were treated with FCCP (0.1 mmol/L) to determine maximal oxygen consumption; B: mitochondrial-dependent oxygen consumption rate(baseline-oligomycin) and the ratio between maximal oxygen consumption. Rate and basal oxygen consumption rate were calculated. * $P < 0.05$.

图3 单倍型D4和B4a细胞氧耗量的检测

Fig.3 Analysis of mitochondrial respiration of haplogroup D4 and B4a cells



A: 单倍型D4和B4a细胞线粒体复合体表达水平检测; CI: 复合体I; CII: 复合体II; CIII: 复合体III; CIV: 复合体IV; CV: 复合体V; B: 线粒体各复合体相对表达量, ** $P < 0.01$ 。

A: the haplogroup D4 and B4a cells of mitochondrial complex expression level were measured; CI: complex I; CII: complex II; CIII: complex III; CIV: complex IV; CV: complex V; B: the relative expression of each mitochondrial complex; ** $P < 0.01$ 。

图4 单倍型D4和B4a细胞线粒体复合体水平的检测

Fig.4 Analysis the levels of mitochondrial complexes of haplogroup D4 and B4a cells

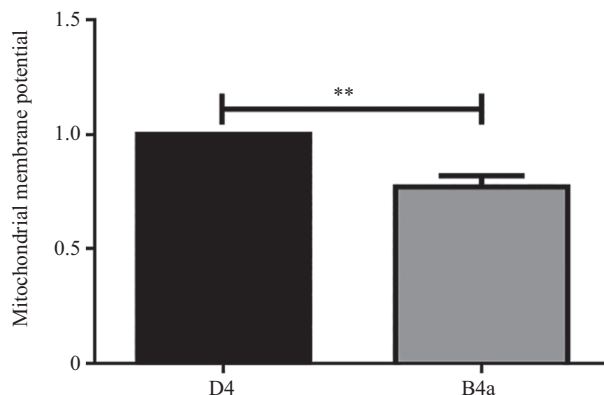
2.7 单倍型D4和B4a细胞内活性氧水平比较

“氧自由基理论”是衰老过程中氧化损伤的经典理论之一^[7]。为验证细胞氧化损伤是否参与了线粒体氧化呼吸功能下降所导致衰老发生的过程, 我们通过DCFH-DA荧光染料对D4和B4a细胞进行染色并检测相应荧光强度, 结果显示, 单倍型B4a细胞内ROS水平明显高于D4细胞, 且具有统计学差异(图6)。此结果说明, 在线粒体氧化呼吸功能降低的单倍型细胞中, 细胞氧化损伤处于较高水平, 从而促进衰老发生。

3 讨论

本文构建了分别作为抑制和促进衰老的mtDNA单倍型D4和B4a的胞质杂合细胞, 并对其线粒体功能进行分析。结果显示, 与单倍型D4相比, 与衰老正相关的mtDNA单倍型B4a细胞线粒体氧化磷酸化功能和生物合成能力均显著下降, 而作为反映氧化损伤重要指标之一的ROS却明显升高。

线粒体作为细胞能量代谢中心, 在细胞生理和病理状态下发挥着重要作用。其中, 衰老发生的标志之一是线粒体代谢的改变^[15], 表现为线粒体呼吸

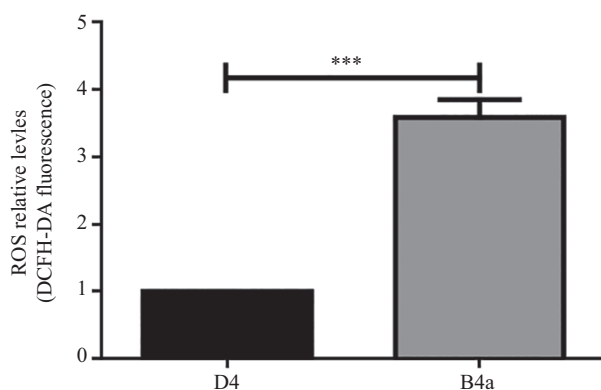


使用TMRM对D4和B4a细胞进行染色以检测线粒体膜电位, 计算线粒体TMRM相对密度值, $**P<0.01$ 。

Haplogroup D4 and B4a cells were stained with the mitochondrial TMRM probe to determine the mitochondrial membrane potential, to calculate relative average mitochondrial TMRM intensity; $**P<0.01$.

图5 单倍型D4和B4a细胞线粒体膜电位的检测

Fig.5 Analysis of mitochondrial membrane potential of haplogroup D4 and B4a cells



使用DCFH-DA对D4和B4a细胞进行染色, 检测细胞ROS生成水平, 将D4细胞作为对照计算DCFH-DA相对密度值, $***P<0.001$ 。

Haplogroup D4 and B4a cells were stained with the DCFH-DA probe to determine the the level of ROS generation, the D4 cells were as the control cells to calculate relative average DCFH-DA intensity; $***P<0.001$.

图6 单倍型D4和B4a细胞ROS水平检测

Fig.6 Analysis of the level of ROS generation of haplogroup D4 and B4a cells

能力降低以及氧化损伤增加, 如ATP合成、 Ca^{2+} 稳态、中心代谢途径和自由基生成的改变^[16]。Duicu等^[17]则发现, SD大鼠在衰老过程中, 其心肌组织的线粒体呼吸和线粒体膜电位水平中均明显下降、ROS显著上升、 Ca^{2+} 诱导的线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放增加。此外, Lee等^[18]发现, H_2O_2 诱导的衰老皮肤纤维母细胞的细胞色素C氧化酶活性以及线粒体呼吸能力均表现为下降。以上研究均表明, 线粒体功能的降低是参与衰老发生的一重要因素, 而我们关于mtDNA单倍型D4和B4a的功能研究则进一步支持了这一结论。

19世纪50年代, Harman教授^[7]首次提出氧自由基理论, 这一理论对衰老的机制给予了初步的解释。目前, 随着对线粒体研究的深入, 已经逐步形成

了“线粒体衰老”理论^[19]。该理论认为, 在衰老细胞中, ROS的增加能够导致细胞的氧化损伤增加, 继而引起线粒体呼吸链功能损伤并且ROS得到进一步累积, 最终导致基因的突变从而促进衰老的发生^[19-21]。尽管关于该理论在衰老过程中的作用仍存在争论, 但是研究普遍认为, 线粒体产生的氧自由基是衰老以及衰老相关的疾病发生的重要因素^[22-25]。例如, 通过限制饮食降低线粒体氧化磷酸化所产生的氧化损伤能延缓衰老的发生^[23]。尽管在本研究中, 我们尚未具体探讨线粒体介导的细胞氧化损伤在衰老过程中的具体作用方式。本文通过对D4和B4a在分子流行病学上明确与衰老存在关联的两个mtDNA单倍型的线粒体功能进行分析, 发现线粒体功能的降低可能是促使细胞衰老的一个重要原因, 且主要表现为线粒体功能下降的细胞中细胞氧化损伤增加。

综上所述, 本研究发现, 与衰老正相关的mtDNA单倍型B4a同与衰老负相关的单倍型D4相比, B4a单倍型细胞的线粒体功能显著低于D4, 且B4a单倍型细胞具有更高的线粒体氧化应激。我们推测, 不同mtDNA单倍型通过改变线粒体的氧化磷酸化功能来影响衰老的进程。因此, 若能根据不同个体间mtDNA单倍型的差异, 从饮食结构、生活环境等方面降低衰老高风险的mtDNA单倍型个体的氧化损伤, 提升线粒体活性和生物合成能力, 将为延缓个体衰老的发生提供一定参考。

参考文献 (References)

- Arora D, Singh A, Sharma V, Bhaduria HS, Patel RB. HgsDb: Haplogroups database to understand migration and molecular risk assessment. *Bioinformatics* 2015; 11(6): 272-5.
- Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet* 1997; 61(3): 691-704.
- Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 2015; 16(9): 530-42.
- Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, *et al.* Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes* 2007; 56(2): 518-21.
- Nardelli C, Labruna G, Liguori R, Mazzaccara C, Ferrigno M, Capobianco V, *et al.* Haplogroup T is an obesity risk factor: Mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 631082.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20(4): 145-7.
- Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11(3): 298-300.
- Sun N, Youle RJ, Finkel T. The mitochondrial basis of aging. *Mol Cell* 2016; 61(5): 654-66.
- Barja G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(9): 1167-72.
- Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, *et al.* Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. *Hum Genet* 2007; 121(3/4): 347-56.
- Cai XY, Wang XF, Li SL, Qian J, Qian DG, Chen F, *et al.* Association of mitochondrial DNA haplogroups with exceptional longevity in a Chinese population. *PLoS One* 2009; 4(7): e6423.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. 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): 966-74.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. *Biotechniques* 2011; 50(2): 98-115.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 418-28.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443(7113): 787-95.
- Brand MD, Orr AL, Perevoshchikova IV, Quinlan CL. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br J Dermatol* 2013; 169 Suppl 2: 1-8.
- Duicu OM, Mirica SN, Gheorghesu DE, Privistirescu AI, Fira-Mladinescu O, Muntean DM. Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2013; 91(8): 593-600.
- Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* 2009; 32(2): 113-32.
- Wei YH. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* 1992; 275(3/4/5/6): 145-55.
- Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001; 52(3/4/5): 159-64.
- Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27(7): 647-53.
- Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(52): 18769-70.
- Ruetenik A, Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: From yeast to humans. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1847(11): 1434-47.
- Lee HY, Choi CS, Birkenfeld AL, Alves TC, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, *et al.* Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab* 2010; 12(6): 668-74.
- Speakman JR, Selman C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *Bioessays* 2011; 33(4): 255-9.