

与衰老相关的线粒体功能严重缺陷的胞质杂合细胞的分子特征

沈露茜¹ 袁渭华² 曹颖² 黄蓉² 熊旭升² 李红智^{2*}

(¹首都医科大学宣武医院, 北京 100053; ²温州医科大学检验医学与生命科学学院, 教育部检验医学重点实验室, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 该研究组先前建立了含有不同年龄组小鼠神经细胞线粒体的胞质杂合细胞株(其细胞核基因组背景相同), 发现老年组较年轻组的胞质杂合细胞线粒体总体功能显著降低。为了研究与衰老相关的线粒体功能严重缺陷的胞质杂合细胞的分子特征, 该研究采用3个线粒体总体功能极其低下的老年组胞质杂合细胞株(1个正常功能年轻组胞质杂合细胞株作为对照)作为研究对象。首先, 证实氧耗水平和ATP合成显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。然后, 对线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)进行了高通量测序, 特别是检出突变型比例低的mtDNA异质性突变, 并进一步对呼吸链复合体依赖性氧耗进行了检测。测序结果显示, 在老年组胞质杂合细胞中mtDNA点突变明显积累。这些突变包括非编码区的3个变异, 据DNA保守性分析结果, 其中2个(异质性m.15849G>T、m.16289A>T)可能为有害的; 编码区的4个变异, 据DNA和氨基酸保守性分析及蛋白质功能预测结果, 其中2个(*ND5*基因的同质性m.12496T>C、*Cyt b*基因的异质性m.15199A>T)可能为有害的。进一步研究结果显示, 同时具有复合体I亚基*ND5*(或复合体III亚基*Cyt b*)突变和2个调控区突变的胞质杂合细胞, 其复合体I(或复合体III)依赖性呼吸显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上, 发生于老年组胞质杂合细胞的线粒体总体功能异常, 其原因可能为, mtDNA调控区和编码区的异质性和同质性突变, 以及多重mtDNA突变的累加引起线粒体呼吸链复合体功能的缺陷, 进而导致线粒体总体功能异常, 从而促进衰老。

关键词 线粒体功能; DNA突变; 衰老; 高通量测序; 小鼠; 胞质杂合细胞

Molecular Characteristics of Cybrids with Severe Mitochondrial Dysfunctions Associated with Aging

Shen Luxi¹, Yuan Weihua², Cao Ying², Huang Rong², Xiong Xusheng², Li Hongzhi^{2*}

(¹Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

²Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, College of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract In our previous study, we generated cybrids with identical background of nuclear genome containing mitochondria of synaptosomes from mice at different ages, and found that the overall mitochondrial function in old group was significantly decreased compared with that in young group. To explore the molecular

收稿日期: 2017-03-23 接受日期: 2017-06-02

浙江省自然科学基金(批准号: LY13C070003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699656, E-mail: lhz@wmu.edu.cn

Received: March 23, 2017 Accepted: June 2, 2017

This work was supported by the Fund of the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No. LY13C070003)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699656, E-mail: lhz@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-07-21 17:01:44 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170721.1701.002.html>

characteristics of cybrids with severe mitochondrial dysfunction associated with aging, we tested three cybrids from old group with severe overall mitochondrial dysfunction and one cybrid from young group with normal function as control. After the levers of oxygen consumption and ATP synthesis were ensured with significant decreases ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), high-throughput sequencing was used to detect mitochondrial DNA (mtDNA) mutations, especially detecting heteroplasmic mutations with low abundance, and further, the respiratory chain complex-dependent respiration was examined. The sequencing results showed that point mutations in mtDNA were significantly accumulated in aging cybrids. These mutations included three variations in non-coding region, two (heteroplasmy m.15849G>T, m.16289A>T) of them were likely to be deleterious based on the analysis of DNA conservation; four variations in coding region, two (homoplasmy m.12496T>C in *ND5*, heteroplasmy m.15199A>T in *Cyt b*) of them were likely to be damaging based on the analysis of DNA and amino acid conservation, and the prediction of protein function. Further results showed that cybrids with mutations in subunit ND5 of complex I (or subunit Cyt b of complex III) together with two mutations in control region showed significant decreases in the complex I (or complex III) dependent respiration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In conclusion, the overall mitochondrial dysfunction occurred in aging cells probably resulted from heteroplasmic and even homoplasmic mutations in the regulatory region and coding region of mtDNA. Accumulation of multiple mtDNA mutations could result in impairments in the function of mitochondrial respiratory chain complexes, and thus contributed to overall mitochondrial dysfunction and led to aging.

Keywords mitochondrial function; DNA mutation; aging; high-throughput sequencing; mouse; cybrid

哺乳动物线粒体基因组是全长约16.5 Kb的双链闭环DNA。除主要非编码区(non-coding region, NCR)约1.1 Kb外,线粒体基因组主要由编码序列组成。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)编码37个基因,表达为呼吸链复合体的13个多肽(包括复合体I的ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6,复合体III的Cyt b,复合体IV的COX-I、COX-II、COX-III和复合体V的ATP6、ATP8),还编码与线粒体蛋白质合成相关的22个tRNA和2个rRNA。哺乳动物mtDNA的非编码区一般包含重链复制起始点、重链启动子、轻链启动子、保守序列区、高度可变区和终止相关序列,即包含复制和表达调控的元件^[1]。由于mtDNA靠近活性氧类(reactive oxygen species, ROS)产生部位,且缺乏组蛋白的保护,缺乏广泛有效的DNA修复系统,因此,mtDNA突变率通常较细胞核DNA高^[2]。每个细胞mtDNA具有很高的拷贝数。一个细胞可以是异质性状态,即同时存在野生型和突变型的mtDNA,也可以是同质性状态,即仅存在野生型或突变型的mtDNA。致病的突变往往是异质性的^[3-4],而正常的多态性往往是同质性的。

长期以来,mtDNA突变和氧化压力在衰老中的作用受到重视。几十年来,衰老的线粒体自由基理论(假设mtDNA突变引起具遗传毒性的氧化压力,氧化压力反过来又导致更多的突变)一直是主要的衰

老假说之一^[5]。但是近年来,一些衰老相关mtDNA突变的起因和加剧的证据并不支持该假说^[4,6-10]。

胞质杂合细胞(cybrids)的独特性在于细胞核基因组背景一致,使研究线粒体基因组的单独作用成为可能。为了探讨线粒体在衰老中的作用,本课题组建立了一系列含有不同年龄组小鼠神经细胞线粒体的胞质杂合细胞,发现老年组较年轻组胞质杂合细胞的线粒体总体功能显著降低^[11]。为深入研究与衰老相关的线粒体功能严重缺陷的胞质杂合细胞的分子特征,本研究首先对3个线粒体总体功能极其低下的老年组胞质杂合细胞及1个年轻组胞质杂合细胞正常对照进行mtDNA基因组全序列的高通量测序,特别是检出突变型比例低的mtDNA异质性突变。然后,基于这3个携带不同mtDNA突变的衰老细胞模型,进一步对它们的呼吸链复合体依赖性呼吸进行检测,寻找mtDNA突变导致线粒体总体功能极其低下的原因,以期对mtDNA突变与衰老的关系进行深入的研究,从而为mtDNA突变与衰老关系的分子细胞生物学机制提供直接证据和新见解。

1 材料与方法

1.1 含有小鼠神经细胞线粒体的胞质杂合细胞株的建立

从6、26个月龄(分别代表年轻组、老年组)的

C57BL/6雌性小鼠的脑部分离神经细胞^[11]。小鼠实验已经美国德克萨斯大学圣安东尼奥医学科学中心伦理委员会和温州医科大学伦理委员会同意。采用密度梯度离心法从匀浆的神经细胞中分离得到包含在细胞膜中的线粒体^[11]。缺乏线粒体的 ρ^0 细胞株来源于小鼠细胞株LL/2^[12]。采用PEG将缺乏线粒体的 ρ^0 细胞株与分离得到的线粒体融合,并经嘧啶营养缺陷型培养基选择,建立胞质杂合细胞^[11,13]。各胞质杂合细胞株培养在含10% FBS的DMEM培养液中。

1.2 筛选线粒体总体功能缺陷的胞质杂合细胞株

采用半乳糖培养液筛选得到线粒体总体功能缺陷的胞质杂合细胞株,并采用mtDNA特异的PCR排除那些不含有线粒体的细胞株^[11]。其中,线粒体总体功能严重缺陷的老年组3个胞质杂合细胞株(O25、O49、O77)做为本研究的实验组标本。以线粒体功能正常的年轻组1个胞质杂合细胞株为对照(control)。

1.3 检测氧耗水平

在YSI Model 5300氧气检测仪的小室中测量氧耗。将 5×10^6 个细胞置于TD缓冲液中记录基本氧耗,然后加2.5 $\mu\text{g/mL}$ 寡霉素A记录抑制后的氧耗,最后加0.5 $\mu\text{mol/L}$ FCCP(fuqua client consulting practicum)记录最大氧耗。

1.4 检测ATP合成

采用ATP试剂盒(Invitrogen公司, A22066),荧光素酶法检测ATP合成。 2×10^6 个细胞在缓冲液中煮沸5 min,然后 $10\,000 \times g$ 离心1 min。细胞裂解上清液与标准反应液混合,采用SynergyTM HT多功能微孔板检测仪检测发光。用ATP溶液建立标准曲线。除检测基本ATP合成外,在收获前加15 $\mu\text{g/mL}$ 寡霉素A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min检测抑制后的ATP合成。

1.5 采用高通量测序检测mtDNA突变

1.5.1 PCR扩增小鼠mtDNA 采用文献报道的4对引物^[14]分别扩增片段A(1 663~6 234)、片段B(5 943~10 829)、片段C(10 701~15 395)和片段D(15 200~1 846)。该4个片段覆盖整个小鼠mtDNA基因组。采用Phanta[®] EVO HS高保真DNA聚合酶对全细胞DNA进行长片段PCR。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ (片段A)或者66 $^{\circ}\text{C}$ (片段B、C、D)1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 循环30次; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

1.5.2 高通量测序 高通量测序由北京德易东方

转化医学研究中心完成。随后,制备文库并检测质量。采用Illumina Hiseq 2500系统进行100 bp长度的两端测序,得到原始数据,去除低质量数据得到有效数据。采用bwa比对软件将测序结果与小鼠mtDNA全基因组NC_005089.1比对。采用Samtools分析得到SNP、Pindel分析得到插入缺失,通过深度和质量值进行过滤得到可靠的突变。

1.5.3 生物信息学分析 采用Clustal X软件分析下列19种脊椎动物^[15](<http://mitomaster.mitomap.org/cgi-bin/index.cgi>)的mtDNA序列保守性,包括*Mus musculus* NC-005089、*Gorilla gorilla* NC-011120、*Hylobates lar* NC-002082.1、*Lemur catta* NC-004025、*Pan paniscus* NC-001644、*Homo sapiens* NC-012920.1、*Thylamys elegans* NC-005825、*Procavia capensis* NC-004919.1、*Cavia porcellus* NC-000884.1、*Orycteropus afer* NC-002078.1、*Bos taurus* NC-006853、*Sus scrofa* NC-000845、*Felis catus* NC-001700.1、*Platanista minor* NC-005275.1、*Herpestes javanicus* NC-006835.1、*Alligator mississippiensis* NC-001922.1、*Cyprinus carpio* NC-001606、*Gallus gallus* AY235570.1、*Xenopus laevis* NC-001573.1。将本研究标本小鼠的序列位点对应于人类剑桥参考序列(Cambridge reference sequence, CRS)位点,mtDNA编码的氨基酸保守性系数(conservation index, CI)、跨膜区预测和蛋白质功能预测的结果来源于大数据(Genbank中至2015年2月为止收录的所有约5 000种真核生物氨基酸序列)的分析结果^[16],其蛋白质功能预测采用Mitoclass 1和Polyphen 2数据库。

1.6 检测呼吸链复合体依赖性呼吸

约 5×10^6 个细胞经洋地黄皂苷通透,悬浮在缓冲液中,在YSI Model 5300氧气检测仪的小室中测量呼吸链复合体依赖性呼吸。检测期间依次加下列各种底物和抑制剂(最终浓度): 苹果酸盐(5 mmol/L)、谷氨酸盐(5 mmol/L)、琥珀酸盐(5 mmol/L)、3-磷酸甘油(5 mmol/L)、抗坏血酸盐(10 mmol/L)、TMPD(0.2 mmol/L)、NADH(0.5 mmol/L)、鱼藤酮(100 nmol/L)、黄酮(0.5 mmol/L)、抗霉素A(20 nmol/L)和KCN(1 mmol/L)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,通过One-Way ANOVA比较平均值差异。先检验方差同质性,如果齐性,则P值经Dunnett计算,否则经Dunnett's T3

计算。当 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 老年胞质杂合细胞氧耗水平的变化

老年胞质杂合细胞株O25、O49、O77与年轻对照相比, 未经处理细胞的(即基本的)氧耗均极显著降低($P < 0.01$, 图1A), 对抑制剂寡霉素A(能阻断ATP合成)的敏感性(图1B)、对解偶联剂FCCP(能使氧化与磷酸化完全解偶联, 从而使氧耗水平提高至最大)的反应(图1C)均显著降低($P < 0.05$)。这表明, 老年胞质杂合细胞株O25、O49、O77线粒体氧化磷酸化功能均严重缺陷。

2.2 老年胞质杂合细胞ATP合成的变化

老年胞质杂合细胞株O25、O49、O77与年轻对照相比, 未处理细胞的(即基本的)ATP含量显著低

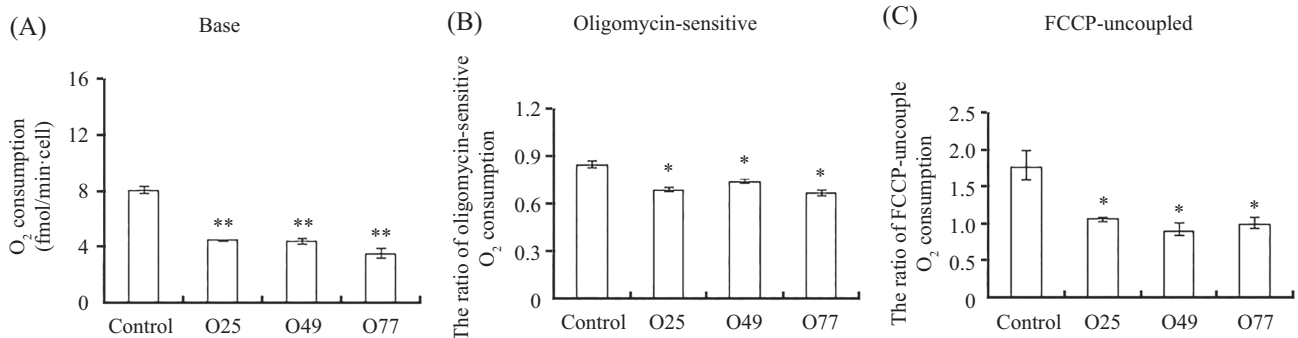
下($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图2A), 对抑制剂寡霉素A的敏感性显著降低($P < 0.05$, 图2B)。这表明, 老年胞质杂合细胞O25、O49、O77线粒体氧化磷酸化功能均严重缺陷。

2.3 高通量测序检测老年胞质杂合细胞的mtDNA突变结果

用作高通量测序标本的小鼠mtDNA全基因组的4个PCR扩增片段的电泳结果见图3。

老年胞质杂合细胞株O25、O49、O77及年轻对照的高通量测序结果见表1, 表1中仅列入突变率大于5%的且有意义的突变。

所发现的有编码区点突变(突变率大于5%)的基因包括COX-I、ATP6、ND5、Cyt b, 除COX-I的m.5942C>T为同义突变外, 其余均为错义突变, 除ND5的为纯质性突变外, 其余均为异质性突变。

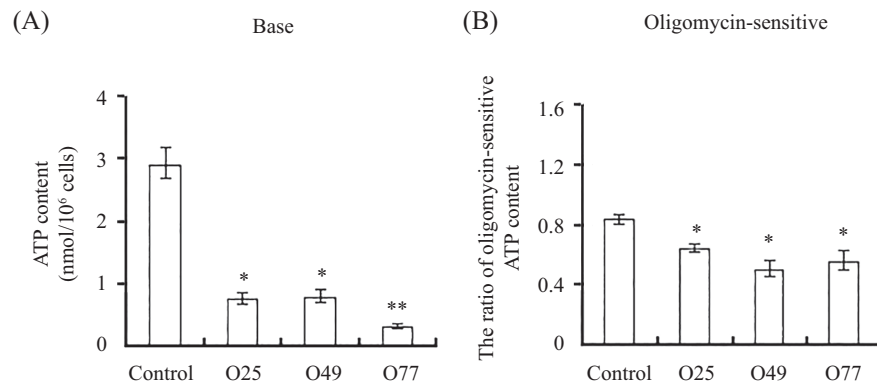


A: 未经处理细胞的(即基本的)氧耗; B: 对寡霉素敏感的氧耗的比率[(基本的-对寡霉素不敏感的)/基本的]; C: FCCP解偶联的氧耗的比率(经FCCP处理的/基本的)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照胞质杂合细胞比较。

A: the oxygen consumption in intact cells; B: the ratio of oligomycin-sensitive [(base-oligomycin resistant)/base] oxygen consumption; C: the ratio of FCCP-uncoupled (FCCP/base) oxygen consumption. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control cybrid.

图1 老年胞质杂合细胞的氧耗水平

Fig.1 Oxygen consumption of the aging cybrids

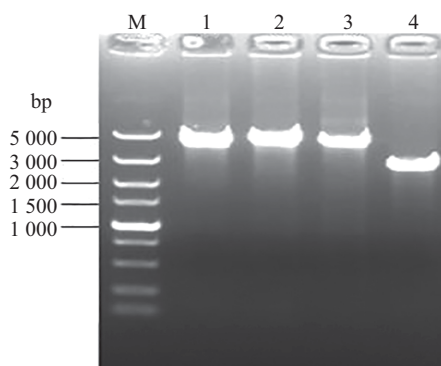


A: 基本的ATP含量; B: 对寡霉素敏感的ATP含量的比率[(基本的-对寡霉素不敏感的)/基本的]。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照胞质杂合细胞比较。

A: the base ATP content; B: the ratio of oligomycin-sensitive [(base-oligomycin resistant)/base] ATP content. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control cybrid.

图2 老年胞质杂合细胞的ATP含量

Fig.2 ATP content of the aging cybrids



泳道M: 分子标记; 泳道1: 4 545 bp; 泳道2: 4 861 bp; 泳道3: 4 677 bp; 泳道4: 2 916 bp。

Lane M: marker; lane 1: 4 545 bp; lane 2: 4 861 bp; lane 3: 4 677 bp; lane 4: 2 916 bp.

图3 小鼠mtDNA全基因组的4个PCR扩增片段

Fig.3 Four PCR-amplified fragments of mouse mtDNA complete genome

表1 高通量测序及生物信息学分析结果

Table 1 The result of high-throughput sequencing and bioinformatic analysis

突变 Mutation	突变率(%)* Mutation rate (%)*				位置 Locus	CI* CI*	aa的变化# Change of aa#	突变 Mutation	对应人类CRS Corresponding in human CRS			
	对照 Control	O25	O49	O77					aa的变化 Change of aa	CI [△]	区域 Region	效应 [☆] Effect [☆]
		O25	O49	O77								
m.12496T>C	0	99.41		94.73	ND5	100%	p.M252T	m.13091T>C	p.M252T	72%	TM	Damaging
m.15199A>T	0	5.55	6.78	11.68	Cyt b	100%	p.Q352L	m.15801A>T	p.Q352L	93%	TM	Damaging
m.15849G>T	0			5.36	NCR	87%		m.16558G>T				
m.16289A>T	0	15.25	14.07	17.56	NCR	60%		Non corresponding				

*列入了突变率>5%的且有意义的突变。除ND5是同质性突变外,其余均为异质性突变。*基于Clustal X对19种脊椎动物mtDNA的分析。
#除COX-I是同义突变外,其余均为错义突变。△基于约5 000种真核生物氨基酸的分析。☆基于Mitoclass 1和Polyphen 2数据库对蛋白质功能的预测。TM: 跨膜。

*The mutations with mutation rate>5% and meaning were listed. Except ND5 was homozygote, others were heterozygote. *Based on the analysis of clustal X for mtDNA of 19 vertebrates. #Except COX-I was synonymous mutation, others were missense mutation. △Based on the analysis for amino acid of around 5 000 eukaryota. ☆Based on the prediction of mitoclass 1 and polyphen 2 database for protein function. TM: transmembrane.

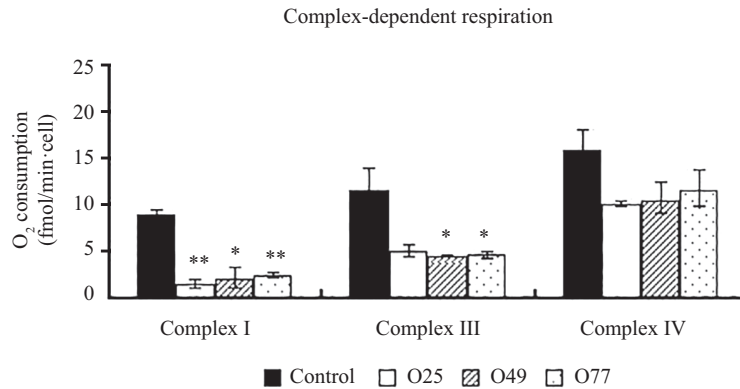
ATP6的m.8023T>C异质性错义突变,因DNA的脊椎动物CI仅32%,故不再进一步讨论其意义。ND5基因的纯质性错义突变m.12496T>C见于O25和O77,该位点DNA的脊椎动物CI为100%。小鼠的该突变相当于CRS的m.13091T>C,氨基酸的真核生物CI为72%,该错义突变位于跨膜结构域,蛋白质功能预测结果为有害的。在人类线粒体基因组数据库(MitoMap)(<http://www.mitomap.org/MITOMAP>)中未见收录13 091位点突变。其他各种搜索仅见1篇文献报道过人类同样突变m.13091T>C,虽其为异质性(突变率8%~23%),但表明可能与认知障碍、脑核磁共振图像异常有关。Cyt b基因的异质性错义突变m.15199A>T见于O25、O49和O77,其中O77突变率相对较高。该位点DNA的脊椎动物CI为100%。小鼠的该突变相当于人类CRS的m.15801A>T,氨基酸的真核生物CI为93%,该错义突变位于跨膜结构域,

蛋白质功能预测结果为有害的。MitoMap中未见收录15 801位点突变。

所发现的非编码区的突变(突变率大于5%)包括3个位点的点突变,均为异质性突变。因其中1个位点(16299A>C)的DNA的脊椎动物CI仅10%,故不再进一步讨论其意义。m.15849G>T(相当于人类CRS的m.16558G>T)仅见于O77,该位点DNA的脊椎动物CI为87%。MitoMap中见m.16558delG、m.16558G>A,未见与本研究同样的m.16558G>T。m.16289A>T进化保守性为60%且未见T(因人类CRS较短,故无其对应位点),O25、O49和O77细胞株异质性突变率相类似。

2.4 老年胞质杂合细胞呼吸链复合体依赖性呼吸的变化

如图4所示,老年胞质杂合细胞株O25、O49、O77与年轻对照相比,O25、O77细胞株的复合体I依



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照胞质杂合细胞比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control cybrid.

图4 老年胞质杂合细胞的复合体依赖性呼吸缺陷

Fig.4 Defects in complex-dependent respiration in aging cybrids

依赖性呼吸极显著降低($P < 0.01$); O49细胞株的复合体I依赖性呼吸显著降低($P < 0.05$); O49、O77的复合体III依赖性呼吸显著降低($P < 0.05$); 未发现复合体IV依赖性呼吸显著降低。

3 讨论

各种研究结果显示, mtDNA突变在老年个体中积累, 这表明, mtDNA突变在哺乳动物衰老中的作用重要^[1,17-20]。本研究结果显示, 老年线粒体中的mtDNA点突变较年轻对照中的高度累积, 包括非编码区变异位点3个(其中2个位点的DNA保守性分析结果可能有害)、编码区变异位点4个(其中2个位点的DNA、氨基酸保守性分析和蛋白功能预测结果可能有害), 前者分布密度较大。Williams等^[21]采用mtDNA(Mito-Seq)的高通量测序研究年轻和年老志愿者的脑部壳核的mtDNA突变谱。他们的结果显示, 单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs)随年龄而增加, 在非编码区的突变密度较大, 编码区突变的氨基酸变化预测结果大多为病理性SNVs。在他们的壳核标本中, 线粒体全基因组范围的总SNVs从25岁到80岁增加2.3倍。本研究采用高通量测序发现的老年相关点突变的结论与Williams等^[21]的类似。

mtDNA的非编码区包含mtDNA复制和编码区基因表达调控的元件, 非编码区的可变性最大^[21], 尤其是其中的高度可变区(hypervariable region, HVR)^[1]。已有研究报道, 在老年个体的肌肉中存在D-loop区5'端的点突变m.A189G^[22-23]。m.A189G突变位点位于mtDNA重链复制起始点(191)的附近, 提

示该突变可能影响mtDNA的复制或维持。本研究发现的小鼠mtDNA非编码区的点突变m.15849G>T, 相当于人类CRS的m.16558G>T, 未见报道同样突变, DNA保守性为87%(表1)。根据Eupedia网站(www.Eupedia.com/List of European mitochondrial DNA haplogroups and subclades with their defining mutations), 人类mtDNA的HVR位于16 001~16 568, 故本研究发现的m.16558G>T位于人类mtDNA非编码区的重链复制起始点、重链启动子、轻链启动子、保守序列区或终止相关序列^[1]。基于本研究结果, 我们推测, 所发现的小鼠mtDNA非编码区的2个点突变(m.15849G>T和m.16289A>T)可能影响编码区基因表达的正常调控。

有关mtDNA突变与人类衰老的关系已在近年有不少研究报道, 包括生殖细胞点突变、体细胞点突变和重排, 但是至今仍不清楚这两者之间仅仅是相关还是存在因果关系^[1]。本研究所采用的胞质杂合细胞的独特性在于不同胞质杂合细胞之间的细胞核基因组背景是一致的, 这使得能够撇开细胞核基因组的影响来准确评价线粒体基因组的作用。研究mtDNA突变小鼠的结果支持mtDNA突变是导致哺乳动物衰老的原因^[9]。但是, 大多数已报道的有关mtDNA突变与衰老相关性的研究, 采用的是从个体中取得的老年组织或细胞, 这些研究不能撇开细胞核基因组对衰老的影响。

本研究结果提示, 编码区和非编码区的mtDNA突变的综合效应导致老年胞质杂合细胞的氧耗水平和ATP合成的降低。O25、O77细胞株的复合体I依

赖性呼吸较年轻组对照极显著降低($P < 0.01$), 可能是复合体I亚基ND5纯质性突变与非编码区异质性突变累加所致, 而O49因ND5无突变故复合体I依赖性呼吸仅显著降低($P < 0.05$)。O49、O77的复合体III依赖性呼吸显著降低($P < 0.05$), 可能是复合体III亚基Cyt b、非编码区异质性突变累加所致, 而O25细胞株因Cyt b异质性突变率最低故复合体III依赖性呼吸无显著降低。总之, 本研究结果提示, 衰老相关mtDNA突变通过降低呼吸链复合体的功能(即通过改变氧化磷酸化机制)导致线粒体总体功能严重缺陷。

异质性mtDNA突变已经被发现存在于各种疾病包括肿瘤以及老年人群中^[2,24-27]。采用高通量测序已经检出较多低比例的异质性突变^[24,28-31]。本研究表明, 突变型比例低的mtDNA异质性突变对线粒体功能具有显著影响, 且不同的mtDNA异质性突变的毒害作用在细胞中具有累加性。研究发现, 只有很少量的mtDNA被证明在基因表达中发挥作用^[12,32-33], 即使低比例的mtDNA突变也能影响线粒体功能^[34]。还有研究发现, 在携带不同mtDNA突变的线粒体之间, 遗传互补是罕见事件^[35], 不同的mtDNA突变的毒害作用在细胞中具有累加性。

除阴性选择^[8,31,36]外, 阳性选择对mtDNA异质性突变也有重要影响^[37], 因为某些突变使mtDNA分子具备选择优势^[5]。本研究结果显示, 在老年胞质杂合体中存在ND5的纯质性突变和Cyt b、非编码区的异质性突变。从以上阳性选择假说推测, 这些突变由于呼吸链复合体的缺陷而引发局部反馈机制, 上调突变mtDNA分子的数量, 即通过阳性选择而进行克隆扩增(特别是ND5突变, 在O25和O77细胞株中已经从异质性的突变扩增为同质性的突变)。

由上可见, 发生于老年细胞的线粒体总体功能异常, 其共同原因可能为mtDNA调控区和编码区的异质性突变, 在衰老进程中, 还可能发生mtDNA编码区的纯质性突变, 多重mtDNA突变的累加引起线粒体呼吸链复合体功能缺陷, 导致线粒体总体功能异常, 从而促进衰老。

参考文献 (References)

- 1 Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol* 2014; 56: 175-81.
- 2 Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;

- 12(10): 685-98.
- 3 Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(11): 555-60.
- 4 Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 2011; 193(5): 809-18.
- 5 Khrapko K, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in aging. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 127: 29-62.
- 6 Pinto M, Moraes CT. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med* 2015; 85: 250-8.
- 7 Keogh M, Chinnery PF. Hereditary mtDNA heteroplasmy: A baseline for aging? *Cell Metab* 2013; 18(4): 463-4.
- 8 Baines HL, Stewart JB, Stamp C, Zupanic A, Kirkwood TB, Larsson NG, *et al.* Similar patterns of clonally expanded somatic mtDNA mutations in the colon of heterozygous mtDNA mutator mice and ageing humans. *Mech Ageing Dev* 2014; 139(100): 22-30.
- 9 Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med* 2013; 273(6): 529-43.
- 10 Shokolenko IN, Wilson GL, Alexeyev MF. Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. *World J Exp Med* 2014; 4(4): 46-57.
- 11 Li H, Sharma L, Li Y, Hu P, Idowu A, Liu D, *et al.* Comparative bioenergetic study of neuronal and muscle mitochondria during aging. *Free Radic Biol Med* 2013; 63: 30-40.
- 12 Bai Y, Shakeley PM, Attardi G. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3): 805-15.
- 13 Bai Y, Park JS, Deng JH, Li Y, Hu P. Restoration of mitochondrial function in cells with complex I deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 25-35.
- 14 Yoon YG, Yang YW, Koob MD. PCR-based cloning of the complete mouse mitochondrial genome and stable engineering in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2009; 31(11): 1671-6.
- 15 Lü F, Qian G, You W, Lin H, Wang XF, Qiu GS, *et al.* Variants in mitochondrial tRNA gene may not be associated with thyroid carcinoma. *Balkan J Med Genet* 2015; 18(2): 59-64.
- 16 Martin-Navarro A, Gaudioso-Simon A, Alvarez-Jarreta J, Montoya J, Mayordomo E, Ruiz-Pesini E. Machine learning classifier for identification of damaging missense mutations exclusive to human mitochondrial DNA-encoded polypeptides. *BMC Bioinformatics* 2017; 18(1): 158.
- 17 Schroeder P, Gremmel T, Berneburg M, Krutmann J. Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. *J Invest Dermatol* 2008; 128(9): 2297-303.
- 18 Fukui H, Moraes CT. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Hum Mol Genet* 2009; 18(6): 1028-36.
- 19 Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, *et al.* DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 2008; 40(4): 392-4.
- 20 Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 683-706.
- 21 Williams SL, Mash DC, Zuchner S, Moraes CT. Somatic mtDNA mutation spectra in the aging human putamen. *PLoS Genet* 2013;

- 9(12): e1003990.
- 22 Del Bo R, Crimi M, Sciacco M, Malferrari G, Bordoni A, Napoli L, *et al.* High mutational burden in the mtDNA control region from aged muscles: A single-fiber study. *Neurobiol Aging* 2003; 24(6): 829-38.
- 23 Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, *et al.* Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 4022-7.
- 24 Sevini F, Giuliani C, Vianello D, Giampieri E, Santoro A, Biondi F, *et al.* mtDNA mutations in human aging and longevity: Controversies and new perspectives opened by high-throughput technologies. *Exp Gerontol* 2014; 56: 234-44.
- 25 Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013; 106(1): 135-59.
- 26 Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol* 2012; 226(2): 274-86.
- 27 Lombes A, Aure K, Bellanne-Chantelot C, Gilleron M, Jardel C. Unsolved issues related to human mitochondrial diseases. *Biochimie* 2014; 100: 171-6.
- 28 He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, *et al.* Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 2010; 464(7288): 610-4.
- 29 Li M, Schonberg A, Schaefer M, Schroeder R, Nasidze I, Stoneking M. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. *Am J Hum Genet* 2010; 87(2): 237-49.
- 30 Payne BA, Wilson JJ, Yu-Wai-Man P, Coxhead J, Deehan D, Horvath R, *et al.* Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 2013; 22(2): 384-90.
- 31 Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(29): 10654-9.
- 32 D'Aurelio M, Pallotti F, Barrientos A, Gajewski CD, Kwong JQ, Bruno C, *et al.* *In vivo* regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 46925-32.
- 33 Villani G, Attardi G. *In vivo* control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3/4): 202-10.
- 34 Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, *et al.* A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet* 2008; 17(12): 1814-20.
- 35 Enriquez JA, Cabezas-Herrera J, Bayona-Bafaluy MP, Attardi G. Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 11207-15.
- 36 Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(11): a021220.
- 37 Li M, Schroeder R, Ni S, Madea B, Stoneking M. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(8): 2491-6.