

线粒体DNA数目不同的人角质形成细胞模型的建立

倪一平 王小娟 孙一丹 张莉 马陈西南 刘纪廷 严锐 陶莎莎 张洁 安艳*

(苏州大学公共卫生学院, 苏州 215123)

摘要 该研究采用溴化乙锭(ethidium bromide, EtBr)对人永生化角质形成细胞(HaCaT)进行诱导, 采用RT-PCR法、MTT法和健那绿染色技术联合鉴定EtBr对HaCaT细胞线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数的影响, 建立不同mtDNA拷贝数目的HaCaT细胞模型。结果显示, HaCaT细胞经100 ng/mL和50 ng/mL EtBr分别处理10 d后, 细胞形态随着处理时间的延长发生改变, 由规则铺路石形状逐渐变圆, 某些细胞体积变小, 成团生长, 细胞膜边缘不光滑, 且随着mtDNA数目的减少, 细胞增殖速率明显下降。RT-PCR分析结果显示, 与对照组相比, 50 ng/mL和100 ng/mL EtBr处理10 d的HaCaT细胞中, mtDNA的拷贝数分别减少了52.9%和97.6%[以线粒体DNA脱氢酶1(mitochondrial NADH dehydrogenase 1 gene, *ND1*)与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)的比值来表示mtDNA的相对拷贝数变化情况]。健那绿染色显示, 对照组HaCaT细胞中可见分散存在的蓝绿色线粒体颗粒, 100 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞中, 显微镜下蓝绿色线粒体颗粒明显减少。综上所述, 该研究证明了HaCaT细胞可通过EtBr诱导被成功培养成p⁻细胞, 且EtBr浓度与HaCaT细胞mtDNA拷贝数的变化在一定的范围内存在着剂量-效应关系。

关键词 线粒体DNA; 线粒体DNA缺失HaCaT细胞系; 溴化乙锭

Establishment of HaCaT Cell Model with Different Mitochondrial DNA Numbers

Ni Yiping, Wang Xiaojuan, Sun Yidan, Zhang Li, Ma Chenxinan, Liu Jiting, Yan Rui, Tao Shasha, Zhang Jie, An Yan*

(School of Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract In this study, the HaCaT cell model with different mitochondrial DNA (mtDNA) numbers was established based on ethidium bromide (EtBr) induction. The copy number of mtDNA was identified by RT-PCR, MTT assay and Janus Green B staining technique. The results showed that the cell morphology changed significantly, for instance, the shape of the polygon was gradually rounded, some cells became smaller and the edge of cell were not smooth, after HaCaT cells were exposed to EtBr for 1 and 10 days in 100 ng/mL and 50 ng/mL dosage. Along with the decrease of mtDNA number, the cell proliferation efficiency decreased significantly. RT-PCR analysis showed that compared with the normal control group, there were 52.9% and 97.6% of the mtDNA copy numbers in the HaCaT cells which had treated with 50 ng/mL and 100 ng/mL EtBr for 10 days, respectively [the ratio of *ND1* (mitochondrial NADH dehydrogenase 1 gene)/*GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) to the relative copy number of mtDNA changes]. Janus Green B staining showed that the blue-green mitochondrial

收稿日期: 2017-03-16 接受日期: 2017-06-21

国家自然科学基金(批准号: 81573173、81473008、81673203)和江苏省高校基金(批准号: 16KJB330009)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0512-65880910, E-mail: dranyan@126.com

Received: March 16, 2017 Accepted: June 21, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573173, 81473008, 81673203) and the University Science Research Project of Jiangsu Province (Grant No.16KJB330009)

*Corresponding author. Tel: +86-512-65880910, E-mail: dranyan@126.com

网络出版时间: 2017-08-16 16:48:02 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1648.008.html>

granules existed in the control group, which meant the mitochondria remained normal activity in the control group cells. While there were no blue-green mitochondrial under the microscope in exposed cells, indicating that EtBr could induce HaCaT cells changed into ρ^- HaCaT cells. It meant that HaCaT cells could be successfully cultured into ρ^- cell lines under EtBr exposure, and a dose-dependent manner was occurred between the changes of mtDNA copy and EtBr exposure. In conclusion, HaCaT cells can be successfully cultured into ρ^- cells by EtBr induction, and the changes of mtDNA copy number with EtBr are in a dose-dependent manner.

Keywords mitochondrial DNA; mitochondrial DNA deletion HaCaT cell line; ethidium bromide

存在于所有真核细胞内的线粒体是物质氧化磷酸化和ATP合成的主要场所, 参与呼吸链的电子传递、能量代谢、细胞凋亡以及维持细胞内钙铁离子平衡等多种重要的生物学过程。线粒体呼吸链是由一系列的递氢反应和递电子反应按照一定顺序排列而成。它将代谢物脱下的成对氢原子传递给氧生成水, 同时合成ATP。线粒体也是产生ROS(reactive oxygen species)的主要来源, 主要受核DNA(nuclear DNA, nDNA)与线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的双重调控^[1]。mtDNA因缺乏组蛋白保护而呈现裸露的闭合双链环状结构, 且易受到氧化损伤, 因此, 其突变率要明显高于nDNA。研究发现, 人体多种疾病的发展(如乳腺癌^[2]、肺癌^[3]、脑损伤^[4]等)的形成与mtDNA异常之间存在多种相关性。近年来, mtDNA突变累积与衰老之间的关系也引起了人们越来越多的重视^[5-7]。上述线粒体相关疾病机制研究中常用到mtDNA缺失或无线粒体功能的 ρ^0 细胞模型。mtDNA缺失的细胞系为研究mtDNA突变所致疾病的分子机制等方面提供了条件。溴化乙锭(ethidium bromide, EtBr)插入无核蛋白保护的mtDNA分子层状排列的碱基对之间, 从而与mtDNA的双链牢固结合抑制mtDNA的复制和转录, 而nDNA的复制和转录却不受影响。但在已有报道中, 并未见人角质形成细胞(HaCaT) ρ^0 细胞模型, 且现有的模型中mtDNA拷贝数常拘泥于有或无两种极端情况^[8-9], 很少关注mtDNA不同数目时对疾病发生发展的影响。

本研究以HaCaT细胞为母本细胞, 采用EtBr诱导法建立mtDNA缺失的HaCaT细胞模型, 将mtDNA缺失的HaCaT定义为 ρ^- HaCaT。联合采用RT-PCR和健那绿染色技术检测EtBr对HaCaT细胞mtDNA拷贝数的影响, 通过MTT检测mtDNA缺失细胞增殖的变化, 验证mtDNA缺失对细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

永生化人角质形成细胞株由大连医科大学高阳明教授惠赠。

1.2 试剂

本实验所用的试剂包括: 溴化乙锭(EtBr)(美国Amresco公司)、丙酮酸钠(美国Amresco公司)、尿嘧啶(美国Amresco公司)、细胞全基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、SYBR Green Mix(美国Roche公司)、MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)、Janus Green B(美国Sigma公司)和 ρ^0 筛选培养基(美国Hyclone公司)。

常规培养基成分包括: 4.5 g/L的高糖DMEM培养基(美国Hyclone公司)、10%胎牛血清(美国Hyclone公司)、青/链霉素(上海碧云天生物科技有限公司)和0.25%胰蛋白酶(上海碧云天生物科技有限公司)。

1.3 细胞培养与分组

HaCaT细胞常规培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM中, 37 °C、5% CO₂孵箱中培养。待细胞生长状态良好时, 换用 ρ^- 培养基(含不同浓度EtBr的诱导培养基)继续培养, 其中对照组(control组)为不添加EtBr的传代组。根据文献报道, EtBr处理浓度以及时间筛选实验方案见表1^[10-11], 根据预实验结果处理, 筛选出所用EtBr浓度与时间, 继续实验。

1.4 光镜下观察 ρ^- HaCaT细胞形态变化以及对尿嘧啶和丙酮酸钠的依赖性

将经50 ng/mL和100 ng/mL EtBr分别处理10 d后的HaCaT细胞分别接种于筛选培养基(不含丙酮酸钠与尿嘧啶)和外源性给予丙酮酸钠与尿嘧啶的培养基中继续培养, 与各自对照组相比, 观察细胞生长、形态以及死亡情况。收集两组细胞, 采用酶标

表1 HaCaT细胞EtBr处理浓度与时间筛选试验方案

Table 1 The protocol of selected the concentrations and treatments time of EtBr

分组	血清	青霉素(U/mL)	链霉素(U/mL)	尿嘧啶(mg/L)	丙酮酸(mg/L)	溴化乙锭(ng/mL)	时间(d)
Group	Serum	Penicillin (U/mL)	Streptomycin (U/mL)	Uracil (mg/L)	Pyruvate (mg/L)	EtBr (ng/mL)	Time (d)
Control	10%	100	100	50	100	0	1, 10
1	10%	100	100	50	100	25	1, 10
2	10%	100	100	50	100	50	1, 10
3	10%	100	100	50	100	100	1, 10
4	10%	100	100	50	100	200	1, 10

表2 *ND1*与*GAPDH*引物序列Table 2 *ND1* and *GAPDH* primer sequence

基因名称	引物序列(5'→3')
Gene name	Primer sequence (5'→3')
<i>ND1</i>	Forward primer: CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT
	Reverse primer: GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T
<i>GAPDH</i>	Forward primer: CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA
	Reverse primer: AGA GTT GTC AGG GCC CTT TT

仪检测细胞增殖情况, 严格按照MTT试剂盒说明书进行操作。

1.5 RT-PCR检测p-HaCaT细胞mtDNA缺失情况

将诱导10 d之后的各组细胞经胰蛋白酶消化, 室温条件下3 000 r/min离心5 min, 收集细胞。参照细胞全基因组DNA提取试剂盒的操作说明提取细胞全基因组DNA。紫外分光光度计测定吸光度 D_{260} 和 D_{280} 值, 确定DNA纯度及含量。

采用mtDNA编码的*ND1*(mitochondrial NADH dehydrogenase 1 gene)扩增mtDNA, 以*GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)作内参基因(表2)。将DNA样品用DEPC水稀释至50 ng/ μ L, 建立25 μ L反应体系(表3)。

RT-PCR的循环参数: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min; 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C复性1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共40个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每组设定6个复孔, 3个孔扩增nDNA, 3个孔扩增mtDNA。扩增后, 运用GeneAmp 5700 SDS software软件对PCR反应的动态曲线和溶解曲线等进行分析, 使用7500 RT-PCR System的分析软件, 将HaCaT对照组细胞*ND1*/*GAPDH*的比值设定为1, 利用Comparative CT方法计算EtBr处理后HaCaT细胞的mtDNA相对拷贝数。

1.6 Janus Green B染色法鉴定p-HaCaT细胞线粒体失活情况

参照王磊等^[12]的实验方法, 将0.5 g Janus Green B(健那绿)溶解于50 mL生理盐水中, 加温到30~40 $^{\circ}$ C,

表3 25 μ L反应体系的成分及其体积Table 3 The composition of the reaction in 25 μ L

成分	体积(μ L)
Composition	Volume (μ L)
SYBR Green Mix	12.5
Template	1
Forward primer (10 μ mol/L)	1
Reverse primer (10 μ mol/L)	1
DEPC water	9.5
Total	25

使其充分溶解, 配制1% Janus Green B染液。待经RT-PCR鉴定的细胞生长融合到80%时加入1% Janus Green B染液2滴, 2~5 min后置于高倍光镜下观察。

1.7 数据统计

实验数据以mean $\pm$ S.D.形式表示, 显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 EtBr作用时间以及作用浓度的筛选

通过查阅文献, HaCaT细胞mtDNA的敲除率实验方案见表1, 其中EtBr的浓度设置分别为: 0、25、50、100、200 ng/mL, 敲除时间为1 d和10 d, 期间收集不同组细胞提取mtDNA, 进行RT-PCR检测其拷贝数变化情况。

实验结果显示, 200 ng/mL EtBr处理第1 d即导致细胞大量死亡; 50 ng/mL和100 ng/mL EtBr在分别作用1 d和10 d以后, 线粒体DNA的敲除率分别达到了21.5%、55.1%和78.8%、96.3%(表4), 能较好地呈现mtDNA所处的不同浓度状态, 所以我们挑选50 ng/mL和100 ng/mL两种EtBr浓度, 作用时间分别为1 d和10 d, 继续进行后续实验。

2.2 细胞形态的改变

对照组中正常HaCaT细胞呈铺路石样, 体积大而饱满, 轮廓分明, 胞内干净无杂质, 胞核清晰可见(图1A)。50 ng/mL EtBr诱导10 d后, HaCaT细胞生长速度较对照组慢, 且细胞形态部分出现异常(图1B)。100 ng/mL EtBr诱导10 d后, HaCaT细胞增殖速度明显低于对照组, 形状逐渐变圆, 某些细胞体积变小, 成团生长, 细胞肿胀, 胞膜边缘不光滑且向外渗透,

胞内有杂质, 核质分界不清晰(图1C)。

2.3 细胞生长变化

50 ng/mL和100 ng/mL EtBr分别处理10 d后, 与对照组相比, 50 ng/mL处理组细胞增殖不明显, 细胞数目基本不变。100 ng/mL处理组细胞48 h内培养基完全变黄, 细胞漂浮死亡, 数量下降, 到72 h时贴壁细胞基本不增殖, 细胞大量死亡(图2)。

2.4 丙酮酸钠与尿嘧啶依赖性实验

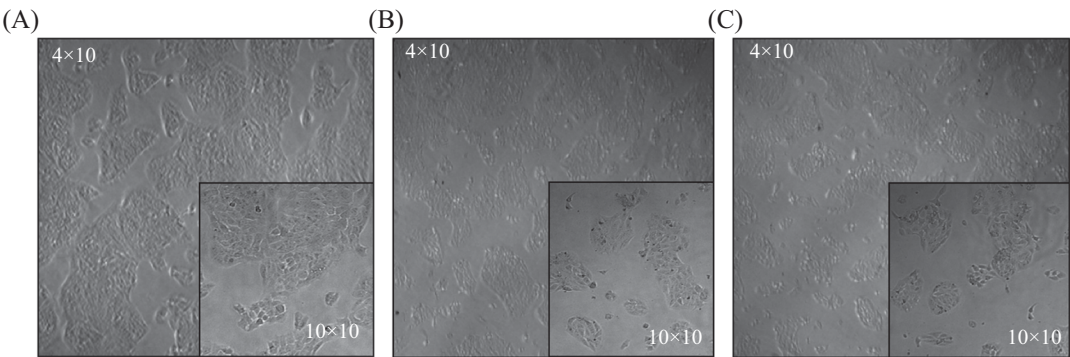
50 ng/mL和100 ng/mL EtBr分别处理10 d后的HaCaT细胞, 接种于含丙酮酸钠与尿嘧啶的培养基中继续培养72 h, 发现在不含丙酮酸钠与尿嘧啶的对照组中, 大量细胞悬浮, 贴壁较少, 生长缓慢甚至停止, 且形态不清晰。在外源性给予丙酮酸钠与尿嘧啶的处理组中, 50 ng/mL和100 ng/mL处理组中的细胞均能维持正常增殖能力(图3)。

表4 细胞mtDNA敲除率计算结果

Table 4 Calculation results of cell mtDNA knockout numbers

分组 Group	溴化乙锭(ng/mL) EtBr (ng/mL)	时间(d) Time (d)	mtDNA敲除率 The ratio of mtDNA knockout
Control	0	1	0
		10	0
1	25	1	11.3%*
		10	43.7%#
2	50	1	21.5%*
		10	55.1%#
3	100	1	78.8%*
		10	96.3%#
4	200	1	—
		10	—

*P<0.05, 与对照组的1 d比较; #P<0.05, 与对照组的10 d比较。“—”表示无数据。
*P<0.05 compared with 1 d control group; #P<0.05 compared with 10 d control group. “—” means no data.



A: 对照组; B: 50 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞组; C: 100 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞组。
A: control group; B: HaCaT cells after 50 ng/mL EtBr treatment for 10 days group; C: HaCaT cells after 100 ng/mL EtBr treatment for 10 days group.

图1 50 ng/mL和100 ng/mL EtBr分别处理10 d后HaCaT细胞光镜下形态的变化

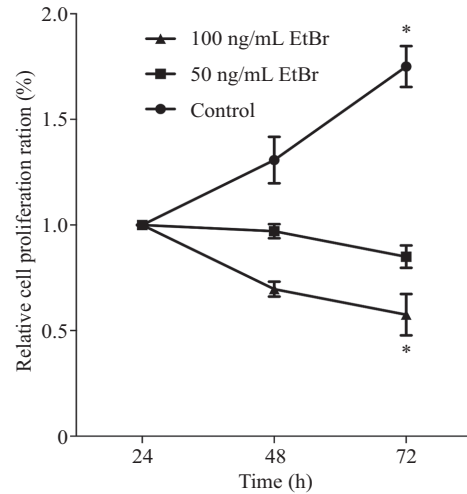
Fig.1 The morphological changes of HaCaT cells after 50 ng/mL and 100 ng/mL EtBr treatment for 10 days

2.5 EtBr处理后 ρ^0 -HaCaT细胞mtDNA拷贝数的变化

分别用50 ng/mL和100 ng/mL EtBr处理1 d和10 d后的HaCaT细胞, 参照全基因组DNA提取说明提取细胞全基因组DNA, 进行RT-PCR实验。结果显示, 50 ng/mL EtBr处理1 d和10 d后HaCaT细胞mtDNA拷贝数分别减少了19.5%和52.9%; 100 ng/mL EtBr处理1 d和10 d后mtDNA拷贝数分别减少了73.9%和97.6%(表5)。

2.6 Janus Green B染色检测线粒体活性实验

Janus Green B(健那绿)染色显示, 对照组HaCaT细胞中可见分散存在的蓝绿色线粒体颗粒(图4A); 50 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞中, 胞质内仍可见散在的线粒体颗粒, 但数量较对照组明显减少(图4B); 100 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞中, 显微镜蓝绿色线粒体颗粒明显减少(图4C)。

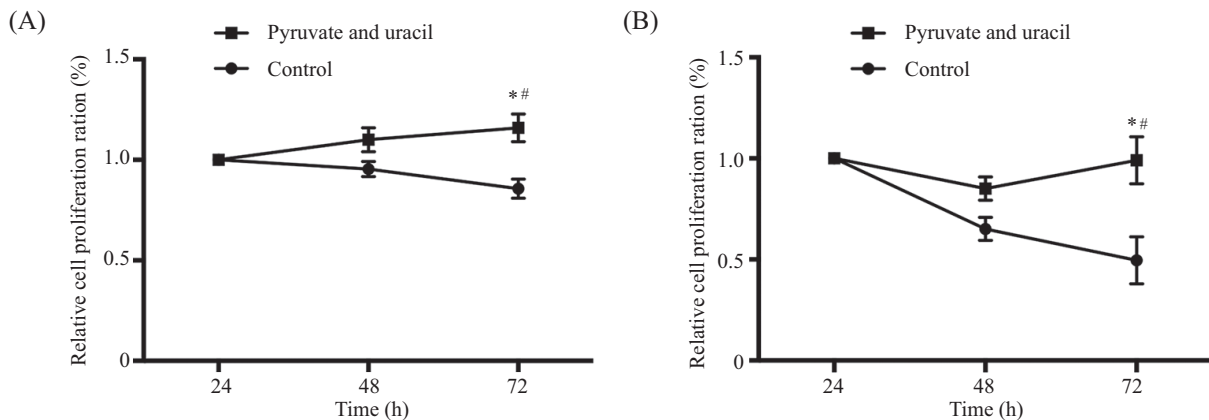


* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ compared with control group.

图2 50 ng/mL和100 ng/mL EtBr分别处理10 d后HaCaT细胞增殖情况

Fig.2 HaCaT cell proliferation after 50 ng/mL and 100 ng/mL EtBr treated for 10 days



A: 50 ng/mL EtBr处理10 d后HaCaT细胞组; B: 100 ng/mL EtBr处理10 d后HaCaT细胞组; * $P < 0.05$, 72 h时添加丙酮酸和尿嘧啶的处理组与24 h处理组相比较; * $P < 0.05$, 72 h时添加丙酮酸和尿嘧啶处理组与72 h对照组相比较。

A: 50 ng/mL EtBr treated for 10 d group; B: 100 ng/mL EtBr treated for 10 d group; * $P < 0.05$ compared with themselves between 24 h and 72 h; * $P < 0.05$ compared with control group at 72 h.

图3 营养缺陷实验鉴定 ρ^0 -HaCaT细胞对尿嘧啶与丙酮酸钠的依赖性

Fig.3 Nutritional defects identification of ρ^0 -HaCaT dependence on uracil and sodium pyruvate

3 讨论

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器, 是细胞进行有氧呼吸的重要场所。mtDNA是独立于核外、可稳定遗传的基因组。不同于nDNA的是, mtDNA结构中无组蛋白的保护, 因长期暴露于氧化磷酸化所致的高浓度氧化物中, 其突变率比nDNA高出许多。自1988年, Holt等^[13]和Wallace等^[14]分别在线粒体脑病和Leber's遗传性视神经病患者的细胞中发现了mtDNA突变后, mtDNA

突变与人类疾病的相关性便成为了研究的新领域。

随着研究的深入发现, mtDNA拷贝数的改变除了与肿瘤的发生相关外, 还与心血管疾病和一些代谢性疾病的发生发展密切相关。在上述疾病相关机制的研究中, 常用到mtDNA完全缺失的 ρ^0 细胞^[15]。 ρ^0 细胞是一类mtDNA缺失的细胞系, 其特点为无二氢乳氢酸脱氢酶活性, 具有尿嘧啶和丙酮酸依赖性。人类第一个 ρ^0 细胞株是King于1989年在骨肉瘤细胞143B.TK中制备成功的。随后, 又有很多种细胞被

表5 不同浓度EtBr处理1 d和10 d后HaCaT细胞中mtDNA数目变化情况

分组	mtDNA相对拷贝数
Group	The relative number of mtDNA
Control	1.000±0.036
ρ ⁰ HaCaT(a)	0.805±0.084*
ρ ⁰ HaCaT(b)	0.471±0.007*
ρ ⁰ HaCaT(c)	0.261±0.009*
ρ ⁰ HaCaT(d)	0.024±0.002*

ρ⁰HaCaT(a): 50 ng/mL EtBr处理1 d的HaCaT细胞; ρ⁰HaCaT(b): 50 ng/mL EtBr处理10 d的HaCaT细胞; ρ⁰HaCaT(c): 100 ng/mL EtBr处理1 d的HaCaT细胞; ρ⁰HaCaT(d): 100 ng/mL EtBr处理10 d的HaCaT细胞; **P*<0.05, 与对照组比较。
ρ⁰HaCaT(a): HaCaT cells treated with 50 ng/mL EtBr for 1 day; ρ⁰HaCaT(b): HaCaT cells treated with 50 ng/mL EtBr for 10 days; ρ⁰HaCaT(c): HaCaT cells treated with 100 ng/mL EtBr for 1 day; ρ⁰HaCaT(d): HaCaT cells treated with 100 ng/mL EtBr for 10 days; **P*<0.05 compared with control group.

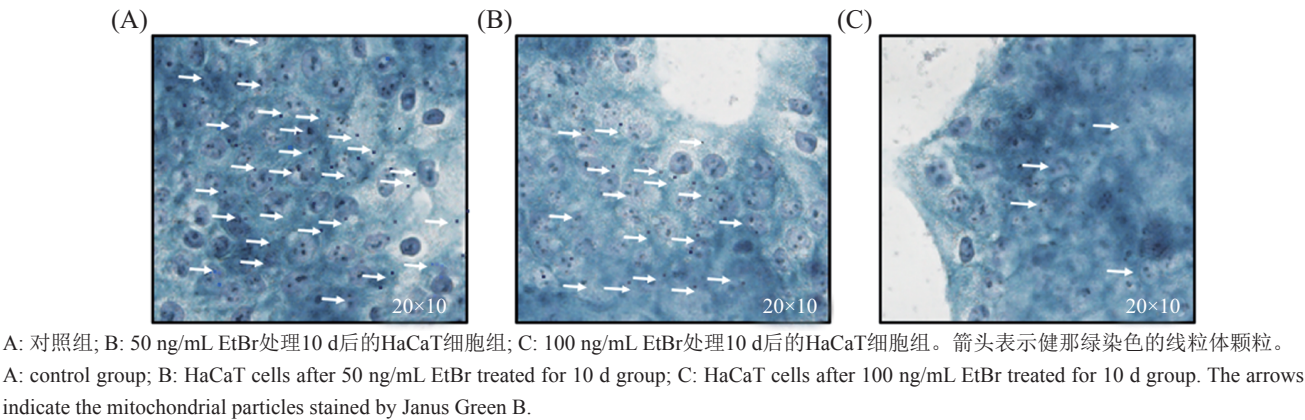


图4 50 ng/mL和100 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞健那绿染色
Fig.4 Janus Green B staining of HaCaT cells after 50 ng/mL and 100 ng/mL EtBr treated for 10 days

陆续培养成ρ⁰细胞株^[16], 但仍有许多细胞株并未成功建立, 且ρ⁰细胞株为mtDNA完全缺失细胞株, 无法研究mtDNA拷贝数不同时对疾病的影响, 这对于一些疾病的研究带来了极大的局限^[17]。

本研究将mtDNA拷贝数改变的细胞定义为ρ⁰细胞, ρ⁰细胞的建立参照ρ⁰细胞的建立方法。ρ⁰细胞的建立方法包括EtBr诱导法、抑制呼吸链复合物I和复合物III的鱼藤酮及抗霉素A诱导法、抗癌药物地特氯胺诱导法等^[18]。EtBr诱导法是经典的方法, 其作用原理是: EtBr可以与mtDNA的双链较为牢固的结合, 抑制细胞分裂, 从而使mtDNA的数量逐次减少, 但不影响有组蛋白保护的nDNA的复制^[19]。

本研究根据前期预实验结果, 采用HaCaT细胞作为母本细胞建立ρ⁰细胞, 选用50 ng/mL和100 ng/mL EtBr来影响mtDNA复制, 观察细胞形态以及增殖变化, 间隔一段时间利用RT-PCR法扩增检测HaCaT细胞mtDNA变化情况。研究发现, 在EtBr诱导过程中, 细胞形态逐渐发生改变, 边缘模糊且形态不一致,

细胞增殖能力也明显受到抑制。RT-PCR结果显示, 50 ng/mL EtBr处理1 d和10 d后, HaCaT细胞的mtDNA拷贝数分别减少了19.5%和52.9%; 100 ng/mL EtBr处理1 d和10 d后, HaCaT细胞的mtDNA拷贝数分别减少了73.9%和97.6%。以上结果说明, 经EtBr诱导后, 细胞mtDNA拷贝数会发生显著变化, 且mtDNA的改变可直接影响细胞的增殖速率。

线粒体是真核生物进行氧化代谢的主要场所, 可以将糖类、脂肪和氨基酸等最终氧化并释放能量为机体供能。线粒体负责的最终氧化的共同途径是三羧酸循环与氧化磷酸化, 而氧化磷酸化这一步骤的作用则是利用这些物质还原氧合成ATP, 释放能量^[20]。mtDNA缺失的细胞器线粒体呼吸链功能受损, 而参与尿嘧啶生物合成的二氢乳酸酸脱氢酶位于线粒体内膜上, 它的活性依赖于线粒体呼吸链。其次, 丙酮酸的代谢依赖于三羧酸循环, 当三羧酸循环过程受阻时, 细胞内丙酮酸合成减少^[21-22]。因此, mtDNA缺失的细胞只有依赖外源性尿嘧啶和丙酮

酸才能提供能量而生存。将EtBr诱导10 d后的细胞接种于不含丙酮酸钠与尿嘧啶的培养基中,发现大量细胞悬浮死亡,培养基短时间内变黄,且形态不清晰。而在含丙酮酸钠与尿嘧啶的培养基中,50 ng/mL和100 ng/mL EtBr处理组中的细胞均能正常生长,表现出明显的尿嘧啶与丙酮酸依赖性。

Janus Green B是对线粒体专一性的脂溶性染料,易于被细胞吸收。在正常细胞中,线粒体活性正常,细胞色素氧化酶能使染料保持氧化状态,呈蓝绿色,而在周围的细胞质中染料被还原,成为无色状态。100 ng/mL EtBr处理10 d后的HaCaT细胞,显微镜下观察蓝绿色线粒体颗粒明显减少,说明细胞mtDNA拷贝数的减少会导致线粒体失活,从而影响细胞正常的生长供能。培养过程中,培养基短时间内变黄,也证实了细胞在生长过程中糖代谢活跃并产生大量酸性物质。而RT-PCR与细胞增殖结果提示,EtBr在不同浓度或不同作用时间下,对细胞mtDNA拷贝数的影响也不尽相同,且在一定剂量范围内,二者之间存在着剂量-效应关系。

mtDNA的损伤能影响细胞能量代谢,使细胞赖以生存的能量供应不足,从而影响细胞的分裂和增殖。因此,不同mtDNA数目对相关指标以及对疾病发生发展的影响值得我们考虑。

综上所述,本实验研究结果证实,HaCaT细胞可以经EtBr诱导建立成mtDNA缺失的p-细胞模型。EtBr与HaCaT细胞mtDNA拷贝数的变化在一定的范围内存在着剂量-效应关系,即可以通过控制EtBr的处理浓度以及处理时间,实现不同HaCaT细胞mtDNA拷贝数的梯度变化。本研究结果在模型上弥补了该种细胞模型缺失的不足,为进一步探索线粒体相关疾病的发生机制以及线粒体在自噬和凋亡等生物学过程中的作用提供了细胞模型和新思路。

参考文献 (References)

- Bogenhagen DF. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819(9/10): 914-20.
- Kidd A, Coleman R, Whiteford M, Barron LH, Simpson SA, Haites NE. Breast cancer in two sisters with Friedreich's ataxia. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27(5): 512-4.
- Hosgood HD 3rd, Liu CS, Rothman N, Weinstein SJ, Bonner MR, Shen M, *et al.* Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* 2010; 31(5): 847-9.
- Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK, Krishnan KJ, Reynolds R, Howell O, *et al.* Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 69(3): 481-92.
- Gredilla R, Bohr VA, Stevnsner T. Mitochondrial DNA repair and association with aging—an update. *Exp Gerontol* 2010; 45(7/8): 478-88.
- Gureev AP, Syromyatnikov MY, Gorbacheva TM, Starkov AA, Popov VN. Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice. *Neurosci Res* 2016; 113: 19-27.
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgenuth SE, *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; 309(5733): 481-4.
- Jeng JY, Yeh TS, Lee JW, Lin SH, Fong TH, Hsieh RH. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *J Cell Biochem* 2008; 103(2): 347-57.
- 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 人线粒体DNA缺失肝癌细胞株建立. *中国细胞生物学报*(Zhang Guoqiao, Ling Xianlong, Chen Zhengtang. Human mitochondrial DNA deletion in hepatocellular carcinoma cell lines was established. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2007; 29(1): 127-30.
- 陈志海. 线粒体DNA敲除细胞模型建立及辐射敏感性研究. 苏州大学(硕士论文)(Chen Zhihai. Establishment of mitochondrial DNA knockout cell model and its radiation sensitivity. Soochow University), 2012.
- 王小娟. 线粒体介导砷致人支气管上皮细胞(HBE)氧化损伤的研究. 苏州大学(硕士论文)[Wang Xiaojuan. Mitochondria-induced arsenic-induced oxidative damage of human bronchial epithelial cells (HBE), Soochow University], 2016.
- 王磊, 程鹤香, 赵倩, 陈鸥, 赵明. 缺失线粒体DNA的人喉癌细胞系的建立. *中国实验诊断学*(Wang Lei, Chen Hexiang, Zhao Qian, Chen Ou, Zhao Ming. Establishment of human laryngeal carcinoma cell line lacking mitochondrial DNA. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*) 2012; 16(11): 1972-5.
- Holt PG, Schonhegrad MA, Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 1988; 167(2): 262-74.
- Wallace SS. AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 1988; 12(4): 431-77.
- Norddahl GL, Pronk CJ, Wahlestedt M, Sten G, Nygren JM, Ugale A, *et al.* Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell* 2011; 8(5): 499-510.
- Sun H, Pan Y, Zeng Z, Fang L, Zhang H, Xie S, *et al.* Observation of radiobiological characteristics in a HepG2 cell line with mitochondrial DNA deletion. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2015; 35(6): 783-8.
- Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K, *et al.* Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: Role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 7512-20.

- 18 Spadafora D, Kozhukhar N, Alexeyev MF. Presequence-independent mitochondrial import of DNA ligase facilitates establishment of cell lines with reduced mtDNA copy number. *PLoS One* 2016; 11(3): e0152705.
- 19 Leibowitz RD. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *J Cell Biol* 1971; 51(1): 116-22.
- 20 Powers JM, Murphy G, Ralph N, O’Gorman SM, Murphy JEJ. Polypharmacy and sun exposure: Implications for mitochondrial DNA deletions in skin. *J Photochem Photobiol B* 2017; 173: 397-403.
- 21 Lee WT, St John J. The control of mitochondrial DNA replication during development and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1350: 95-106.
- 22 Cusimano A, Balasus D, Azzolina A, Augello G, Emma MR, Di Sano C, *et al.* Oleocanthal exerts antitumor effects on human liver and colon cancer cells through ROS generation. *Int J Oncol* 2017; doi: 10.3892/ijo.2017.4049.