携带线粒体tRNA^{Met}4435A>G突变的原发性高血压 家系的线粒体功能研究

黄慧敏^{1,2} 管敏鑫^{1,2*} (¹温州医科大学检验医学院,生命科学学院,温州 325035; ²温州医科大学Attardi线粒体生物医学研究院,温州 325035)

该研究通过构建携带突变的永生化淋巴细胞系、探讨线粒体tRNA^{Met}4435A>G突变(以 摘要 下简称为m.4435A>G)对原发性高血压线粒体功能的影响。首先、提取携带m.4435A>G家系中的静 脉血中的淋巴细胞,建立为永生化类淋巴细胞并设为突变组,同时选取与家系相同G2a1单体型的 正常永生化淋巴细胞为对照组;其次,对两组细胞进行tRNA稳态水平分析、tRNA氨基酰化分析、 Western blot分析、ATP水平检测和线粒体膜电位等实验反映细胞线粒体功能状态。tRNA稳态水 平结果显示,经tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和 tRNA^{Ser(UCN)}标准化后,突变组tRNA^{Met}平均水平分 别为对照组平均水平的57.3%(P=0.012)、62.1%(P=0.006)、53.9%(P=0.021)和50.2%(P=0.037);此 外, 突变组平均tRNA氨基酰化水平为对照组的70%(P=0.023)。异常的tRNA^{Met}代谢会导致线粒体 tRNA编码的多肽减少,根据Western blot结果,突变样本的MT-CO2(以下简称CO2)、ATP6和ND3为 对照样本的88.20%、57.43%和53.92%,并具有统计学差异。此外, m.4435A>G突变会造成细胞氧化 呼吸链损伤、造成细胞线粒体ATP和膜电位水平的降低。结合ATP水平检测结果、突变组ATP水平 平均为对照组的71.5% (P<0.001);并且细胞线粒体膜电位水平显示, 突变组平均线粒体膜电位水平 相比对照组降低38.5%(P<0.001)。m.4435A>G引起tRNA^{Met}稳态水平降低,tRNA^{Met}氨基酰化水平降 低,导致线粒体翻译缺陷,ATP水平降低,膜电位水平降低,这表明,m.4435A>G突变影响了tRNA的 结构和功能,从而改变了线粒体功能。

关键词 原发性高血压;线粒体tRNA^{Met}基因;功能障碍;突变

A Study of Mitochondrial Function in An Essential Hypertension Family Carrying Mitochondrial tRNA^{Met}4435A>G Mutation

HUANG Huimin^{1,2}, GUAN Minxin^{1,2*}

(¹School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract In this study, we explore the effects of tRNA^{Met}4435A>G mutation on the mitochondrial function in patients with essential hypertention. First, lymphocytes extracted from venous blood of an essential hypertention family carrying tRNA^{Met}4435A>G mutation were translated into immortalized lymphocytes, and established as the

收稿日期: 2019-10-16 接受日期: 2019-12-02

国家自然科学基金(批准号: 31401070、81670944)、浙江省自然科学基金(批准号: LY17C060004、LY19H130002)和温州市科技计划项目(批准号: Y20160005、Y20160010)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0571-88206916, E-mail: gminxin88@gmail.com

Received: October 16, 2019 Accepted: December 2, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31401070, 81670944), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY17C060004, LY19H130002) and Wenzhou City Science and Technology Plan project (Grant No.Y20160005, Y20160010)

^{*}Corresponding author. Tel:+86-571-88206916, E-mail: gminxin88@gmail.com

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5174

mutant group. Meanwhile, normal immortalized lymphocytes with the same G2a1 haplotype were selected as the control group. Second, the steady-state level analysis of tRNAs, aminoacylation analysis of tRNAs, Western blot analysis, mitochondrial ATP level detection and the level of membrane potential were performed to reflect the functional of mitochondria. We investigated that cell lines carrying the tRNA^{Met}4435A>G mutation exhibited significant-ly decreased steady-state level of tRNA^{Met} (P<0.05) and aminoacylation of tRNA^{Met} (P=0.023) as compared with control group. The aberrant tRNA^{Met} metabolism resulted in decrease of mitochondrial polypeptides in the mutant group. And according to the results of Western blot, the level of CO2, ATP6 and ND3 in mutant group decreased 11.80%, 42.70% and 46.08% respectively when compared with control group. Furthermore, the m.4435A>G mutation caused respiratory deficiency, markedly diminished mitochondrial ATP levels and membrane potential. And combined with these two experiments, cell lines with tRNA^{Met}4435A>G mutation did decrease 28.50% (P<0.001) mitochondrial ATP level and drop 38.50% (P<0.001) level of membrane potential. Thus, tRNA^{Met}4435A>G mutation caused the decrease of steady-state level of tRNA^{Met}, aminoacylation of tRNA^{Met}4435A>G mutation defect, mitochondrial ATP level and membrane potential. These showed tRNA^{Met}4435A>G mutation affected the structure and function of tRNA, thus changing the function of mitochondria.

Keywords essential hypertention; mitochondrial tRNA^{Met} gene; dysfunction; mutation

心血管疾病的主要影响器官是心脏和血管,据 估计到2025年全球近三分之一人口将患高血压[1-4]。 高血压分为原发性高血压和继发性高血压,其中 患病人群中有95%为原发性高血压[5]。原发性高 血压由生理、遗传、环境和饮食等多种因素相互 作用,病因复杂。有报道发现,高血压患者比健康 人群携带更高比率的线粒体tRNA突变, 突变会对 tRNA前体的加工、核苷酸修饰和氨酰化等过程产 生影响,因此推测线粒体tRNA突变与原发性高血 压相关[6-13]。在4个无遗传相关性的母系遗传高血 压家系中均发现tRNA^{Met}4435A>G突变(以下简称为 m.4435A>G), 说明建立m.4435A>G突变与高血压 之间的联系及其因果关系十分有必要。本研究对 长期收集的原发性高血压样本进行全序列突变筛 查后发现了1例携带m.4435A>G突变的原发性高血 压家系,随后对家系进行临床评估和分子遗传学分 析, 通过tRNA稳态水平分析、tRNA氨基酰化分析、 Western blot印记杂交、ATP水平检测和线粒体膜电 位等实验探究m.4435A>G突变与高血压之间的相 关性。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究通过淋巴细胞永生化技术构建携带 m.4435A>G突变细胞株(II-3和II-6)和相同G2a1单体 型的正常细胞株(C17和C32),分别设为突变组和对 照组。根据温州医科大学研究所评审委员会批准的 方案,获得所有试验者的血液样本及知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 永生化淋巴细胞系建立 将从B95-8细胞中 提取的EB病毒诱导人外周血淋巴细胞来建立永生 化淋巴细胞系,使其成为能连续分裂永久保存的类 淋巴母细胞,从而实现长期在体外研究细胞线粒体 功能和分子遗传机制。所有的细胞均采用10%胎牛 血清的RPMI-1640,置于37 ℃、5% CO₂及饱和湿度 的恒温培养箱中进行培养。

1.2.2 线粒体基因组全序列分析 从外周血或永生 化淋巴细胞中分离试验者的基因组DNA,用24对重 叠引物对试验者整个线粒体基因组进行特异性PCR 扩增,对产物进行纯化后送至测序公司,并将得到的 结果与修订的剑桥标准序列比对^[14],利用Codoncode Aligner进行突变筛查。m.4435发生A>G突变后产生 的ATGCC回文结构可被限制性内切酶*N1a* III识别, 参照人类线粒体全基因组序列(NC_012920.1)利用 Primer Premier 5.0在4435位点前后208 bp和30 bp处设 计上、下游引物4435F和4435R(表1),分别以突变组 和对照组细胞DNA为模版进行特异性扩增包含4435 位点的序列,随后用限制性内切酶*N1a* III对上述PCR 产物进行酶切消化,并进行电泳检测。

1.2.3 tRNA稳态水平检测 提取线粒体RNA以避免核基因编码的RNA的影响。将线粒体总RNA在65°C中加热10 min,在含有7 mol/L尿素的10%聚丙

Table 1 Restriction endonuclease digestion primer parameters of m.4435A>G							
引物名称	引物序列(5'→3')	引物长度/bp	待扩增片段位置				
Name	Sequence of primer $(5' \rightarrow 3')$	Length /bp	Position to be amplified fragment				
4435F	CCC ATT ACA ATC CAG CAT	18	1226 1166				
4435R	CGG GAA GGG TAT AAC CAA C	19	4220-4400				

表1 m.4435A>G突变的酶切引物参数

表2 DIG 标记的tRNA探针

Table 2 third probes with Die labled
核苷酸序列(5'→3')
Nucleotide sequence $(5' \rightarrow 3')$
TAG TAC GGG AAG GGT TAT ACC
TCA CTG TAA AGA GGT GTT GGT TCT CTT AAT CTT
TGT TAA GAA GAG GAA TTG AAC CTC TGA CTG TAA
GCA TCA ACT GAA CGC AAA TCA GCC ACT TTA ATT
CAA GCC AAC CCC ATG GCC TC
TCA CTG TAA AGA GGT GTT GGT TCT CTT AAT CTT
CCT TGG AAA AAG GTT TTC ATC TCC

烯酰胺凝胶中电泳,缓冲液为1×TBE,然后由凝胶转至尼龙膜上与地高辛标记的tRNA^{Met}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和tRNA^{Ser(UCN)}在杂交炉中进行杂交,探针序列信息见表2。

1.2.4 tRNA氨基酰化水平检测 变性的线粒体总 RNA在含有3 mol/L NaAc(pH5.0)的7 mol/L尿素/10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 0.1 mol/L NaAc(pH=5.0) 为缓冲液,凝胶转至尼龙膜后与地高辛标记的 tRNA^{Met}、tRNA^{Lys}和tRNA^{Thr}在杂交炉中进行杂交,探 针序列信息见表2。

1.2.5 蛋白质水平检测 将变性的蛋白质在十二 烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶中电泳,随后,将蛋白质 转移至PVDF膜上并用5%脱脂奶粉封闭。使用的一 抗包括兔抗ND3、鼠抗MT-CO2(以下简称CO2)、兔 抗ATP6、兔抗ATP8和TOM20,二抗为辣根过氧化物 酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)和辣根过氧化物酶标记 山羊抗兔IgG(H+L)。应用ECL系统检测蛋白质信号。

1.2.6 ATP水平检测 每个细胞系取1×10⁴个细胞, 葡萄糖组的细胞在ATP标准反应液中加1 mol/L的葡 萄糖, 2-脱氧-D-葡萄糖组的细胞在ATP标准反应液中 加500 mmol/L的2-脱氧-D-葡萄糖和500 mmol/L的丙 酮酸钠, 两组裂解细胞后与荧光素/荧光素酶试剂一 起同时孵育, 使用SpectraMax M5微孔板光度计测量。 1.2.7 线粒体膜电位检测 应用JC-10荧光染料 (Abcam)并结合流式细胞术检测细胞线粒体膜电位 水平。将1×10⁶个细胞接种在6孔板中,加入JC-10染 料在5% CO₂、37 °C条件下孵育30 min。阳性对照 在染色前需进行预处理:在5% CO₂、37 °C条件下, 将阳性组细胞用10 µmol/L解偶联剂羰基氰化3-氯苯 (CCCP)孵育30 min。应用BD-Accuri-C6流式细胞仪 测定*Ex/E*m为490/590 nm和490/530 nm的荧光强度 比(FL590/FL530)表示细胞的线粒体膜电位水平。

1.3 致病性评分

根据YARHAM团队^[15]2011年更新的致病性线 粒体tRNA突变评分系统标准对tRNA^{Met}4435A>G突 变的致病性做出判断。

1.4 统计学处理方法

实验数据均采用统计学软件SPSS 17.0进行数据分析, P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 家系分析和临床评估

图1为携带m.4435A>G突变的家系图,具有母系遗传的特性。对所有成员进行临床检查后(表3)均 未发现其他疾病,排除为继发性高血压的可能。此 家系3代18名,母系成员8人,其中患原发性高血压6 人,患病率为75%。其中先证者(II-3)发病年龄为54 岁,血压为190/100 mmHg。

2.2 线粒体基因组突变分析

对研究样本进行线粒体全基因组的扩增、测



受影响的个体用填充的符号表示;箭头表示先证者;斜线表示死亡。

T 1 1 3

Affected individuals are indicated by filled symbols; arrow denotes proband; slash indicates death.

图1 一例中国汉族原发性高血压家系图

Fig.1 The Chinese Han pedigree with essential hypertension

	Table 5 Summary of chinical data for some members in a Chinese family carrying in.4455A/G inutation								
编号	性别	检测在龄/岁	发病在龄/岁	血压/mmHg	血清总胆固醇/	低密度脂蛋白/	血清肌酐/		
Sim J	C		Ann - ftent /man	blood pressure	$mmol \cdot L^{-1}$	mmol·L ⁻¹	$mmol \cdot L^{-1}$		
Code Sex	Age of test /year	Age of test /year	/mmHg	TC /mmol·L ⁻¹	$LDL / mmol \cdot L^{-1}$	$CR / umol \cdot L^{-1}$			
II-3	М	60	54	190/100	5.22	3.24	64		
II-5	М	58	_	135/88	3.25	2.18	52		
II-6	F	56	46	150/96	4.30	1.45	58		
II-8	F	53	43	150/100	5.68	2.97	55		
III-4	М	35	—	138/97	2.87	2.32	49		
III-8	М	36	35	155/99	5.59	3.15	87		

ৰ	表3	一个携	帝 m	.4435A>	·G突变的	中国	家糸中音	部分成	员的临	际信息	ļ		
	. f .	1::1 d	ata f		h	·	Chinana	£		••••	142E A	-0-	

TC表示血清总胆固醇; LDL表示低密度脂蛋白; CR表示血清肌酐。表中横线(一)表示发病年龄不详。

TC means serum total cholesterol; LDL means low density lipoprotein; CR meas serum creatinine. The horizontal line (—) in the table indicates that the age of onset is unknown.

序,并将测序结果与标准剑桥参考序列比对。结果显示,突变组均携带m.4435A>G突变(图2A),同时还存在多个多态性位点(表4)。将上述突变位点进行跨物种保守性分析,发现m.4435位点高度保守,保守性为100%,其余均为不保守的多态性位点;单体型分析为东亚线粒体单体型G2a1^[16]。同时对照组为相同单体型但不携带m.4435A>G突变的正常细胞株。酶切结果显示,突变组PCR产物可被切割为比例相当的208 bp和30 bp两个片段;而对照组不能被酶切割,产物仍为238 bp的片段(图2B)。证明突变组携带m.4435A>G突变,对照组不含突变。

2.3 线粒体tRNA稳态水平检测结果

为了检测m.4435A>G对线粒体tRNA^{Met}稳态水平的影响,分别提取对照组和突变组线粒体RNA,应用Northern blot印记杂交电泳,从氨基酸酸碱性和tRNA所在重轻链角度考虑,依次使其与地高辛标记的tRNA探针进行杂交,分别以tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和tRNA^{Ser(UCN)}为参考,对线

粒体 tRNA^{Met}的总量进行标准化。如图 3A显示, m.4435A>G突变组 (II-3和 II-6) tRNA^{Met}的稳态水 平均明显低于对照组(C17和C32)。如图3B所示, 经过 tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和 tRNA^{Ser(UCN)} 标准化后,突变组tRNA^{Met}平均水平分别为对照组 平均水平的 57.3%(P=0.012)、62.1%(P=0.006)、 53.9%(P=0.021)和 50.2%(P=0.037)。而其余线粒 体 tRNA,包括 tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和 tRNA^{Ser(UCN)}的稳态水平差异均无统计学意义。

2.4 线粒体tRNA氨基酰化水平检测结果

通过检测tRNA氨酰化水平进一步探究 m.4435A>G对线粒体tRNA^{Met}结构及稳定性的影响。 在酸性条件下(pH5.0),将线粒体RNA与地高辛标记 的tRNA^{Met}、tRNA^{Thr}和tRNA^{Lys}探针进行Northern杂交, 计算氨酰化tRNA占总tRNA比值即可检测tRNA氨 酰化水平。结果如图4A所示,上方的条带电泳速度 较慢,为氨酰化的tRNA;下方的条带电泳速度较快, 为未氨酰化的tRNA。灰度分析结果如图4B显示,突



A: the sequencing peak map of mitochondrial DNA 4435 site; B: quantification of the m.4435A>G mutation by PCR-RFLP; C: the secondary structure of tRNA^{Met}.

图2 tRNA^{Met}基因m.4435A>G突变的鉴定和定量 Fig.2 Identification and quantification of m.4435A>G mutation in the tRNA^{Met}gene

变组tRNA^{Met}的氨酰化比例分别为对照组的76.2%至63.8%,平均为70.0%(P=0.023),而tRNA^{Thr}和tRNA^{Lys}的氨酰化比例差异无统计学意义。

2.5 蛋白质水平检测结果

用Western blot检测线粒体编码的呼吸链复 合体的4个多肽的表达水平,分别为属于复合体I 的ND3亚基、复合体IV的CO2亚基及复合体V的 ATP6和ATP8亚基^[17-18]。以TOM20内参进行归一 化定量分析^[19],如图5结果所示,m.4435A>G细胞 中CO2、ATP6和ND3的平均水平分别为对照细 胞平均值的88.20%(P=0.04)、57.43%(P=0.01)和 53.92%(P=0.03)。

2.6 ATP水平检测结果

为了进一步研究m.4435A>G是否会影响线粒体氧化磷酸化的能力,分别在以1 mol/L葡萄糖(设为A组)、500 mmol/L 2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)和500 mmol/L丙酮酸(设为B组)为碳源的培养基检测突变组和对照组细胞ATP水平^[20]。如图6结果显示,在A组中,突变组与对照组细胞ATP水平无显著差异;在B组中,细胞糖酵解产能被抑制,细胞只能通过线粒体产生ATP,此时突变组平均ATP产量是对照组的68%和75%,平均值为71.5%(P<0.001)。

2.7 线粒体膜电位检测结果

为了更深入地探究m.4435A>G突变对细胞功能 的影响,使用JC-10荧光探针检测对照组和突变组线 粒体膜电位,记录并计算对照组和突变组间的荧光 强度比FL590/FL530从而评估线粒体膜电位水平^[20]。 实验结果如图7所示,结合流式细胞图(图7A和图7B) 能直观地看到线粒体膜电位水平的变化。图7C显示, 突变组两株细胞的膜电位分别为对照组的78.5%和 44.4%,平均为61.5%(P<0.001);而经解偶联剂CCCP 处理后(图7D),突变组与对照组ATP产量无显著性 差异(P=0.290)。

2.8 致病性评分结果

根据评分系统标准,tRNA^{Met}4435A>G突变的最终评分为13(表5),提示该突变可能会致病^[15]。

3 讨论

该家系的临床资料、遗传和分子特征等证据表 明其具有母系遗传性原发性高血压的特点,这提示, 线粒体基因组在其中发挥作用。对先证者及家系所 有母系成员的线粒体基因组进行测序,发现母系成 员均携带m.4435A>G突变。建立携带m.4435A>G突 变和相同G2a单体型不含突变的正常细胞永生化淋 巴细胞,通过一系列实验研究m.4435A>G突变与原 发性高血压的相关性。

从二级结构图(图2C)得出, m.4435位点位于 tRNA反密码子环上第37位, 此部位核苷酸经常被修 饰, 如硫醇化和甲硫醇化修饰^[21-22]。37位的修饰有 助于密码子识别的高保真度以及功能性tRNA的结 构形成和稳定水平^[23]。此外, 该修饰通过增加密码 子--反义碱基的支持来稳定tRNA和mRNA之间的相

基因 Gene	位点 Position	碱基替换 Replacement	保守性* Conservation (H/B/M/X)*	rCRS†	II-3	C17	是否已报道 : Previously reported :
D-loop	73	A to G		А	G	G	Y
	152	T to C		Т	С		Y
	263	A to G		А	G	G	Y
	310	T to TC		Т	TC	CTC	Y
	316	G to GG		G	GG		Y
	489	T to C		Т	С	С	Y
	16223	C to T		С	Т	Т	Y
	16227	A to G		А	G		Y
	16272	A to G		А	G		Y
	16278	C to T		С	Т		Υ
	16319	G to A		G	А	А	Y
	16362	T to C		Т	С	С	Y
	16519	T to C		Т	С		Y
	709	G to A	G/A/A/-	G	А	А	Y
12S rRNA	750	A to G	A/A/A/-	Α	G	G	Y
	1438	A to G	A/A/A/G	Α	G	G	Y
16S rRNA	2706	A to G	A/G/A/A	А	G	G	Y
	3107	N to del	N/T/T/T	Ν	del N	del N	Y
tRNA ^{Met}	4435	A to G	A/A/A/A	А	G		Y
ND2	4769	A to G	M/M/M/I	Α	G	G	Y
	4833	A to G (Thr to Ala)	T/I/I/L	А	G	G	Y
	4973	T to C	G/G/G/G	Т		С	Y
	5108	T to C	T/S/A/S	Т	С	С	Y
COI	7028	C to T	A/A/A/A	С	Т	Т	Y
<i>CO2</i>	7600	G to A		G	А		Y
	8161	C to T	Y/F/F/Y	С		Т	Y
	8200	T to C	S/S/S/S	Т		С	Y
	8701	A to G (Thr to Ala)	T/L/S/Q	А	G	G	Y
ATP6	8826	A to T	M/M/M/L	А	Т		Y
	8860	A to G (Thr to Ala)	T/A/A/T	А	G	G	Y
CO3	9377	A to G	W/W/W/W	А	G		Y
	9540	T to C	L/L/L/L	Т	С	С	Y
	9575	G to A	P/P/P/P	G	А		Y
	9966	G to A (Val to Ile)	V/V/V/V	G		А	Y
ND3	10398	A to G (Thr to Ala)	T/T/T/A	А	G	G	Y
	10400	C to T	T/T/T/A	С	Т	Т	Y
ND4	10873	T to C	P/S/S/S	Т	С	С	Y
	11719	G to A	G/G/G/G	G		А	Y
ND5	12681	T to C	N/N/N/S	Т		С	Y
	12705	C to T	I/L/L/T		Т	Т	Y
	13563	A to G	L/L/L/L	А	G		Y
	14034	T to C	I/I/T/M	Т	С	С	Y
ND6	14569	G to A (Ser to Thr)	S/S/S/A	G		А	Y
CytB	15043	G to A	G/G/G/G	G	А		Y
	15301	G to A	L/L/L/L	G	А		Y
	15323	G to A (Ala to Thr)	A/A/A/S	G	А	А	Y
	15326	A to G (Thr to Ala)	M/I/T/I	А	G	G	Y

表4 II-3和C17的线粒体DNA全序分析 Table4 mtDNA variants of II-3 and C17

*数据显示,在人(H)、小鼠(M)、牛(B)和非洲爪蟾(X)中,多肽或rRNA的核苷酸的氨基酸保守性。†rCRS表示修订的剑桥参考序列。‡在http//www.mitomap.org and http://www.genpat.uu.se/mtDB/中获得更多信息。

*Data show the conservation of amino acid for polypeptides or nucleotide for rRNAs, in human (H), mouse (M), bovine (B), and *Xenopus laevis* (X). †rCRS indicates revised Cambridge reference sequence. ‡Check http//www.mitomap.org and http://www.genpat.uu.se/mtDB/ for more information.



A:将来自不同细胞系的2 µg总线粒体RNA通过变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,分别与5个地高辛标记的寡核苷酸探针进行电印迹和杂交; B: tRNA水平的量化,以tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ala}和tRNA^{Ser(UCN)}为参考,对线粒体tRNA^{Met}的总量进行标准化,即为对照组和突变组每个细胞的 平均相对tRNA^{Met}含量。

A: 2 µg of total mitochondrial RNA from various cell lines were electrophoresed through a denaturing polyacrylamide gel, electroblotted and hybridized with five DIG-labeled oligonucleotide probes, respectively; B: quantification of tRNA levels. Average relative tRNA^{Met} content per cell, was normalized to the average content per cell of tRNA^{Lys}, tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Ala} and tRNA^{Ser(UCN)} in the mutant and control cell lines.







A:在4 ℃条件下,将对照组和突变组纯化的2 μg总线粒体RNA在含有7 mol/L尿素的酸性(pH5.0) 10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电印迹后分别与 地高辛标记的寡核苷酸探针tRNA^{Met}、tRNA^{Thr}和tRNA^{Lys}进行杂交;B:对照组和突变组tRNA^{Met}的氨基酰化比例。

A: 2 µg of total mitochondrial RNA purified from control and mutant cell lines under acid conditions were electrophoresed in 10% polyacrylamide gel (pH5.0) containing 7 mol/L urea at 4 °C, and electroblotted as well as hybridized with DIG-labeled oligonucleotide probes for the tRNA^{Met}, tRNA^{Thr} and tRNA^{Lys}, respectively; B: aminoacylated proportions of tRNA^{Met} in the mutants and controls.

图4 线粒体tRNA氨基酰化水平分析

Fig.4 Aminoacylation assays of mitochondrial tRNA

互作用,并使其位置的碱基不与内环上的碱基结合, 从而维持反密码子环的结构。m.4435A>G突变可能 破坏A37的原始修饰,从而改变了tRNA^{Met}的结构和 稳定性,导致tRNA代谢异常,从而引起线粒体和细 胞的功能障碍。

对tRNA的稳态水平进行研究发现,突变组 tRNA^{Met}的稳态水平相对对照组平均下降44.1%,通 常引起临床表型阈值为70%,提示m.4435A>G突 变不能独立诱导临床表型^[24-25]。此外,突变组中 tRNA^{Met}的氨基酰化效率比对照组平均值降低了 30%, tRNA^{Met}的氨酰化效率降低导致tRNA^{Met}代谢的 不稳定,使其更容易降解,从而加重tRNA^{Met}代谢紊 乱。线粒体tRNA作为氨基酸转运分子,确保了翻译 的准确性,在合成线粒体电子传递链各个复合体蛋 白质中发挥着重要作用。在本研究中,线粒体编码 产物CO2、ATP6和ND3含有不同比例的甲硫氨酸密 码子,与对照组相比,突变组中三种线粒体翻译产物 的平均水平分别下降了11.80%、42.57%和46.08%,



A:将来自不同细胞系的25 μg线粒体蛋白通过变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,与4个多肽(线粒体DNA编码呼吸复合物的亚基)杂交,Tom20作为 内参对照;B:对两个突变细胞系和两个对照细胞系中的CO2、ATP8、ATP6和ND3进行定量。

A: 25 µg mitochondrial proteins from various cell lines were electrophoresed through a denaturing polyacrylamide gel, electroblotted and hybridized with 4 polypeptides (mtDNA encoded subunits of respiratory complexes) and with Tom20 as a loading control; B: quantification of CO2, ATP8, ATP6 and ND3 in two mutant cell lines and two control cell lines.





A: 总细胞ATP水平, 细胞在以1 mol/L葡萄糖为碳源的培养基中孵育后, 应用多功能酶标仪进行检测; B: 线粒体ATP水平, 细胞在以500 mmol/L 2-DG和500 mmol/L 丙酮酸为碳源的培养基中孵育后, 应用多功能酶标仪进行检测。

A: ATP level in total cells.Cells were incubated with 1 mol/L glucose and were detected by spectramax M5; B: ATP level in mitochondria.cells were incubated with 500 mmol/L 2-deoxy-d-glucose plus 500 mmol/L pyruvateand were detected by spectramax M5.

图6 线粒体ATP产生水平降低



提示线粒体tRNA^{Met}稳态水平降低会导致线粒体翻 译功能的缺陷。线粒体tRNA和多肽代谢水平异常 会造成细胞氧化呼吸链损伤,最终表现为细胞功能 异常^[26-30]。为进一步明确m.4435A>G突变对细胞功 能的影响,对突变组与对照组细胞的ATP水平、线 粒体膜电位进行检测。实验结果显示,突变组线粒 体ATP产量较对照组降低28.50%,且线粒体膜电位 水平相比对照组降低38.50%,正常的线粒体膜电 位是维持线粒体氧化磷酸化产能的先决条件,表明 m.4435A>G突变影响线粒体氧化磷酸化能力。

综上所述,线粒体4435A>G突变改变了线粒体 tRNA^{Met}的结构和功能,影响了线粒体tRNA^{Met}的代 谢和线粒体翻译功能以及氧化磷酸化能力与原发性 高血压的发生具有相关性,然而在该家系母系成员 中表现出原发性高血压的不完全患病率,表明该突 变并不足以独立产生临床表型,其他的因素如核基 因修饰、表观遗传学、环境因素及生活习惯等可能 参与了原发性高血压的发生和发展。



A: 无10 μmol/L CCCP处理, C17和II-6细胞株的代表性流式细胞仪图像; B: 10 μmol/L CCCP处理, C17和II-6细胞株的代表性流式细胞仪图像; C: 无 10 μmol/L CCCP处理, 两组线粒体膜电位水平; D: 10 μmol/L CCCP处理, 两组线粒体膜电位水平。使用JC-10荧光染料对突变组和对照组样本进行 染色后, 应用BD-Accuri-C6流式细胞仪测定*Ex/Em=*490/590 nm和490/530 nm的荧光强度比(FL590/FL530)表示每个样本的线粒体膜电位水平。 A: represented flow cytometry images of cell lines C17 and II-6 without 10 μmol/L CCCP ; B: represented flow cytometry images of cell lines C17 and II-6 without 10 μmol/L CCCP; D: the level of mitochondrial membrane potential with 10 μmol/L CCCP. The mitochondrial membrane potential in mutant and control groups were analyzed by BD-Accuri-C6 flow cytometer using a fluorescence probe JC-10 assay. The ratio of fluorescence intensities *Ex/Em=*490/590 nm and 490/530 nm were record to delineate the level of mitochondrial membrane potential membrane potential of each sample.

图7 线粒体膜电位降低

Fig. / Reduced level in mitochondrial membrane poten
--

Table 5 The Pathogenicity Scoring System of m.4435A>G mutation								
核苷酸改变	得分		总分分类					
Nucleotide change	Score		Classification of total score					
More than one independent report	Yes (2)	2	(1)≤6points—neutral polymorphisms					
	No (0)		(2)7-10 points—possibly pathogenic					
Evolutionary conservation of the base or base-pair	One change (2)	2	(3)11-13 points (not including evidence					
	Two changes (1)		from singlefiber, steady-state level, or trans- mitochondrial cybrid studies)—probably					
	Multiple changes (0)							
Variant heteroplasmy	Yes (2)	0	pathogenic					
	No (0)		(4) \geq 11 points (including evidence from					
Segregation of the mutation with disease	Yes (2)	2	single fiber, steady-state level or trans-					
	No (0)		mitochondrial cybrid studies)-definitely					
Histochemical evidence of mitochondrial disease	Strong evidence (2)	0	pathogenic					
	Weak evidence (1)							
	No evidence (0)							
Biochemical defect in complexes I, III, or IV	Yes (2)	2						
	No (0)							
Evidence of mutation segregation with biochemical	Yes (3)	0						
defect from single-fiber studies	No (0)							
Mutant mt-tRNA steady-state level studies or evi-	Yes (5)	5						
dence of pathogenicity in trans-mitochondrial cybrid	No (0)							
studies								
Total score		13						

表5 m.4435A>G突变致病评分系统 The Pathogoniaity Serving System of m 4425 A>C n

229

参考文献 (References)

- JIA Z, ZHANG Y, LI Q, et al. A coronary artery disease-associated tRNAThr mutation altered mitochondrial function, apoptosis and angiogenesis [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(4): 2056-74.
- [2] YANG Q, KIM S K, SUN F, et al. Maternal influence on blood pressure suggests involvement of mitochondrial DNA in the pathogenesis of hypertension: the Framingham Heart Study [J]. J Hypertens, 2007, 25(10): 2067-73.
- [3] METTIMANO M, LANNI A, MIGNECO A, et al. Angiotensinrelated genes involved in essential hypertension: allelic distribution in an Italian population sample [J]. Ital Heart J, 2001, 2(8): 589-93.
- [4] EHRET G B. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2010, 12(1): 17-25.
- [5] NIKITIN A G, LAVRIKOVA E Y, CHISTIAKOV D A. The heteroplasmic 15059G>A mutation in the mitochondrial cytochrome b gene and essential hypertension in type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab Syndr, 2012, 6(3): 150-6.
- [6] GONZALEZ-VIOQUE E, BORNSTEIN B, GALLARDO M E, et al. The pathogenicity scoring system for mitochondrial tRNA mutations revisited [J]. Mol Genet Genomic Med, 2014, 2(2): 107-14.
- [7] WANG S, LI R, FETTERMANN A, et al. Maternally inherited essential hypertension is associated with the novel 4263A>G mutation in the mitochondrial tRNAIle gene in a large Han Chinese family [J]. Circ Res, 2011, 108(7): 862-70.
- [8] QIU Q, LI R, JIANG P, et al. Mitochondrial tRNA mutations are associated with maternally inherited hypertension in two Han Chinese pedigrees [J]. Hum Mutat, 2012, 33(8): 1285-93.
- [9] LIU Y, LI R, LI Z, et al. Mitochondrial transfer RNAMet 4435A>G mutation is associated with maternally inherited hypertension in a Chinese pedigree [J]. Hypertension, 2009, 53(6): 1083-90.
- [10] WILSON F H, HARIRI A, FARHI A, et al. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA [J]. Science, 2004, 306(5699): 1190-4.
- [11] BOHNSACK M T, SLOAN K E. The mitochondrial epitranscriptome: the roles of RNA modifications in mitochondrial translation and human disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(2): 241-60.
- [12] ZHOU M, XUE L, CHEN Y, et al. A hypertension-associated mitochondrial DNA mutation introduces an m(1)G37 modification into tRNA(Met), altering its structure and function [J]. J Biol Chem, 2018, 293(4): 1425-38.
- [13] HUANG X T, LIU X, YE C Y, et al. Iron-induced energy supply deficiency and mitochondrial fragmentation in neurons [J]. J Neurochem, 2018, 147(6): 816-30.
- [14] ANDREWS R M, KUBACKA I, CHINNERY P F, et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [J]. Nat Genet, 1999, 23(2): 147.
- [15] YARHAM J W, AL-DOSARY M, BLAKELY E L, et al. A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations [J]. Hum Mutat, 2011, 32(11): 1319-25.
- [16] KONG Q P, BANDELT H J, SUN C, et al. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(13): 2076-86.

- [17] LODI R, MONTAGNA P, CORTELLI P, et al. 'Secondary' 4216/ ND1 and 13708/ND5 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations do not further impair *in vivo* mitochondrial oxidative metabolism when associated with the 11778/ND4 mitochondrial DNA mutation [J]. Brain, 2000, 123 (Pt 9): 1896-902.
- [18] MUHLIA-ALMAZAN A, MARTINEZ-CRUZ O, NAVARRETE DEL TORO MDE L, et al. Nuclear and mitochondrial subunits from the white shrimp Litopenaeus vannamei F(0)F(1) ATP-synthase complex: cDNA sequence, molecular modeling, and mRNA quantification of atp9 and atp6 [J]. J Bioenerg Biomembr, 2008, 40(4): 359-69.
- [19] BOUCHARD L, TCHERNOF A, DESHAIES Y, et al. ZFP36: a promising candidate gene for obesity-related metabolic complications identified by converging genomics [J]. Obes Surg, 2007, 17(3): 372-82.
- [20] GONG S, PENG Y, JIANG P, et al. A deafness-associated tRNAHis mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(12): 8039-48.
- [21] ALLNER O, NILSSON L. Nucleotide modifications and tRNA anticodon-mRNA codon interactions on the ribosome [J]. RNA, 2011, 17(12): 2177-88.
- [22] SUZUKI T, NAGAO A, SUZUKI T. Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases [J]. Annu Rev Genet, 2011, 45: 299-329.
- [23] BJORK G R, HAGERVALL T G. Transfer RNA modification: presence, synthesis, and function [J]. EcoSal Plus, 2014, 6(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013.
- [24] GUAN M X, ENRIQUEZ J A, FISCHEL-GHODSIAN N, et al. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNASer(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(10): 5868-79.
- [25] LI X, FISCHEL-GHODSIAN N, SCHWARTZ F, et al. Biochemical characterization of the mitochondrial tRNASer(UCN) T7511C mutation associated with nonsyndromic deafness [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(3): 867-77.
- [26] TRINCHI E, BUCCI D, PECORI G. [Bilateral extensor indicis propius muscle of the fingers. Case contribution] [J]. Chir Organi Mov, 1985, 70(4): 393-6.
- [27] FRAZER I H, MACKAY I R, JORDAN T W, et al. Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens [J]. J Immunol, 1985, 135(3): 1739-45.
- [28] KOOPMAN W J, NIJTMANS L G, DIETEREN C E, et al. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(12): 1431-70.
- [29] SARASTE M, WALKER J E. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase [J]. FEBS Lett, 1982, 144(2): 250-4.
- [30] SHIMOMURA Y, OZAWA T. Integral polypeptide composition of Complex III of the mitochondrial electron-transfer chain [J]. Biochem Int, 1984, 8(1): 187-91.