

针对线粒体复合体I基因突变的Leigh综合征 细胞模型的基因治疗研究

沈露茜^{1#} 黄钰婷^{2#} 方合志³ 申钰琪³ 姜庆友³ 熊舒婷³ 李红智^{3*}

(¹首都医科大学附属北京友谊医院神经内科, 北京 100050; ²温州医科大学附属诸暨医院医学检验科, 绍兴 311800;
³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, 温州 325035)

摘要 该研究旨在探讨转导酵母*NDII*基因对线粒体*NDI*基因突变的Leigh综合征细胞模型的恢复效果, 从而为线粒体复合体I基因突变所致Leigh综合征的基因治疗提供研究基础。已知线粒体复合体I的*NDI*基因的m.3697G>A突变是Leigh综合征的致病突变之一。该研究采用已构建的携带该*NDI*基因突变的胞质杂合细胞作为线粒体复合体I基因突变的Leigh综合征细胞模型, 将酵母*NDII*基因的重组慢病毒转导至该细胞模型中表达*NDII*蛋白(即酵母复合体I), 检测*NDII*蛋白对线粒体复合体I各方面功能的恢复效果。酵母*NDII*基因转导该细胞模型后能高效表达并定位于线粒体。转导酵母*NDII*基因可以恢复复合体I酶活性(外源酵母复合体I的补偿)、线粒体有关的氧耗水平、线粒体偶联效率、线粒体有关的ATP水平, 并且可以降低线粒体氧化应激水平、线粒体自噬水平。在线粒体复合体I基因突变的Leigh综合征细胞模型中, 酵母复合体I可以替代性补偿线粒体的氧化磷酸化功能, 并且可以缓解线粒体的氧化应激和自噬状态。该研究结果可以为线粒体复合体I基因突变所致Leigh综合征的基因治疗提供研究基础。

关键词 Leigh综合征; 线粒体复合体I; 基因突变; 基因治疗

The Study of Gene Therapy for a Cell Model of Leigh Syndrome with Mitochondrial Complex I Gene Mutation

SHEN Luxi^{1#}, HUANG Yuting^{2#}, FANG Hezhi³, SHEN Yuqi³, JIANG Qingyou³, XIONG Shuting³, LI Hongzhi^{3*}

(¹Department of Internal Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

²Department of Clinical Laboratory, Zhuji Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Shaoxing 311800, China;

³Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract To provide a research basis for gene therapy of Leigh syndrome caused by mitochondrial complex I gene mutation, this study explored the therapeutic effect of transducing yeast *NDII* gene on the mitochondrial *NDI* gene mutation in a cell model of Leigh syndrome. It is known that m.3697G>A mutation in *NDI* gene of mitochondrial complex I is one of the pathogenic mutations of Leigh syndrome. In this study, the established cybrids carrying the *NDI* gene mutation were used as the cell model of Leigh syndrome with mitochondrial complex I gene mutation. The recombinant lentivirus containing the yeast *NDII* gene was transduced into the cell model. The res-

收稿日期: 2023-02-28 接受日期: 2023-03-22

国家自然科学基金(批准号: 81971291)资助的课题

#共同第一作者

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

Received: February 28, 2023 Accepted: March 22, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81971291)

#These authors contributed equally to this work

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

cued effect of expressed *NDI1* protein (namely yeast complex I) on all aspects of mitochondrial complex I functions were examined. *NDI1* protein was highly expressed and localized in the mitochondria after *NDI1* gene being transduced into the cell model. Transduction of *NDI1* gene restored complex I enzyme activity (compensation by the exogenous yeast complex I), mitochondria-related oxygen consumption level, mitochondrial coupling efficiency, and mitochondria-related ATP level, and reduced mitochondrial oxidative stress and mitophagy level. In the cell model of Leigh syndrome with mitochondrial complex I gene mutation, yeast complex I can compensate the defective oxidative phosphorylation of mitochondria, and relieve mitochondrial oxidative stress and autophagic state. The results of this study may provide a basis for the gene therapy of Leigh syndrome caused by mutations in the mitochondrial complex I genes.

Keywords Leigh syndrome; mitochondrial complex I; gene mutation; gene therapy

哺乳类线粒体呼吸链复合体I(NADH脱氢酶复合体)共有45个亚基,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)编码其中的7个亚基,细胞核DNA编码其余的38个亚基。相对于呼吸链的其他复合体,复合体I在线粒体电子传递过程中的作用尤为重要^[1]。复合体I除参与电子传递外,还参与氧化应激、细胞凋亡、细胞自噬等调节过程^[2-3]。

Leigh综合征(Leigh syndrome, LS)(OMIM #256000)属于神经变性疾病,是一种亚急性坏死性脑脊髓病,虽然患者罕见但疾病症状严重,幼年即致死。已有研究表明,一些参与能量代谢的细胞核和线粒体基因的突变可导致Leigh综合征^[4]。Leigh综合征致病机制中的35%涉及线粒体复合体I的基因突变^[5],而呼吸链缺陷中的42%涉及线粒体复合体I的基因突变^[6],包括线粒体基因组中编码复合体I亚基的基因(如*ND3*、*ND5*、*ND6*、*ATP6*、*ND1*等)的突变^[4,6]和细胞核基因组中编码复合体I亚基及复合体I组装因子的基因(如*NDUFS1*、*NDUFS2*、*NDUFS3*、*NDUFS4*、*NDUFS7*、*NDUFS8*、*NDUFVI*、*NDUFAF2*、*NDUFAF5*、*FOXRED1*等)的突变^[7-11]。可见,Leigh综合征的致病机制是复杂多样的,不是由复合体I某一个相同基因的突变所致的。

已有研究确认,线粒体复合体I的*NDI*基因的m.3697G>A突变是Leigh综合征的致病突变之一^[4,12]。本文作者方合志在之前的工作过程中,已从一位Leigh综合征患者的血小板中分离得到线粒体(其*NDI*基因携带3697G>A突变),并已将该线粒体与Rho 0细胞融合形成胞质杂合细胞^[13]。酵母的*NDI1*(internal NADH-quinone oxidoreductase)基因编码的*NDI1*蛋白虽然为单个亚基蛋白,但有研究表明其可以同源替代哺乳动

物中由45个亚基构成的复合体I^[4]。本研究制备重组慢病毒rLV-*NDI1*,将酵母正常*NDI1*基因导入上述已建立的胞质杂合细胞(复合体I基因突变细胞模型)中,由*NDI1*单个亚基构成复合体I,研究*NDI1*蛋白是否可以补偿由*NDI*基因3697G>A突变引起的线粒体复合体I的各方面功能缺陷。

因酵母复合体I可以整体替代人类复合体I,本研究中的基因治疗方法可以推广应用于任何线粒体复合体I基因突变所致的Leigh综合征,即本研究中的基因治疗方法不仅可以针对线粒体编码的7个亚基,还可以针对细胞核编码的38个亚基及复合体I组装因子的缺陷。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞株来源及其培养

本研究所采用的线粒体复合体I的*NDI*基因突变的Leigh综合征细胞模型是胞质杂合细胞株,之前已由本文作者方合志构建。从一位Leigh综合征患者的血小板中分离得到线粒体(其线粒体DNA的*NDI*基因携带3697G>A突变),然后将该线粒体与人143B细胞核的供体(无线粒体的Rho 0细胞)融合而形成胞质杂合细胞^[13]。在已构建的胞质杂合细胞株中,1个异质性突变率很高的细胞株(3697H)^[13],几乎是纯质性突变型,在本研究中作为复合体I基因突变细胞模型;另1个异质性突变率很低的细胞株(3697L)^[13],几乎是纯质性野生型,在本研究中作为复合体I基因无突变细胞对照。胞质杂合细胞、293T-17细胞(ATCC)均采用DMEM培养液培养,添加10%胎牛血清(FBS, Gibco)。

1.2 重组慢病毒制备、转导

将HA标签序列插入到*NDI1*序列N-端的线粒

体导向序列后面, 构建表达NDII的重组慢病毒载体(pLVX-CMV-HA-NDII-IRES-ZsGreen1)。采用聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)将重组质粒与包装质粒pSPAX2、pMD2.G共转染至293T-17细胞中, 包装重组慢病毒。采用本研究团队之前建立的方法^[15], 将重组慢病毒进行浓缩、纯化, 使其滴度达 1×10^8 TU/mL。采用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为5、聚凝胺浓度为8 $\mu\text{g/mL}$ 的最佳条件转导复合体I基因突变细胞。

1.3 实验分组

对照(Control)组: 空载慢病毒转导3697L细胞株, 即无突变对照组。突变(Mutant)组: 空载慢病毒转导3697H细胞株, 即突变模型组。突变+NDII(Mutant+NDII)组: NDII重组慢病毒转导3697H细胞株, 即突变模型的治疗组。后续各实验均重复3次。

1.4 线粒体的分离

将细胞悬浮于Mito缓冲液中, 在冰上进行匀浆。在4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times\text{g}$ 条件下离心5 min, 取上清; 再于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 条件下离心10 min, 沉淀即为粗提的线粒体。清洗后, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 条件下离心10 min, 沉淀即为精提的线粒体。最后用Mito缓冲液重悬线粒体沉淀。

1.5 Western blot检测HA(NDII)、LC3表达情况

细胞或线粒体经裂解后, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 离心20 min, 取上清检测蛋白浓度。蛋白用10% SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上。室温封闭90 min后, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下分别与鼠抗人HA抗体(1:1 000; CST)、兔抗人LC3抗体(1:1 000; CST)孵育过夜。第二天用HRP标记的二抗(1:1 000)于室温孵育90 min。然后用增强型化学发光液显示, 凝胶成像仪成像。采用ImageJ软件定量。

1.6 激光共聚焦显微镜观察HA(NDII)表达的定位

将细胞铺在爬片上, 加500 nmol/L MitoTracker Red(Thermo)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下染色30 min。清洗细胞后, 室温固定30 min、通透10 min、封闭60 min。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与鼠抗人HA抗体(1:500, CST)孵育过夜。第二天用Alexa Fluor 647标记的二抗(1:500)常温孵育90 min。然后加入DAPI(上海碧云天生物技术有限公司)常温孵育3 min, 加入抗荧光淬灭剂进行封片。在激光共聚焦显微镜下进行观察。MitoTracker(红色)指示线粒体, HA(绿色)指示HA(NDII)表达的区域, DAPI(蓝色)指

示细胞核。

1.7 复合物I酶活性的测定

将上述分离的线粒体在液氮中反复冻融3次, 再测定线粒体蛋白浓度。用U-3900型分光光度计检测复合体I(NADH脱氢酶)和柠檬酸合酶的活性。复合体I酶活性用柠檬酸合酶活性进行校正。在复合体I酶活性测定反应体系(含线粒体蛋白、NADH、泛醌等)中, 测定在波长为340 nm下NADH的氧化速率, 以反映线粒体整体的复合体I酶活性(以Base表示)。通过在上述反应体系中加入复合体I抑制剂鱼藤酮(rotenone, 1 mmol/L)(Sigma-Aldrich)来检测对鱼藤酮不敏感的NADH脱氢酶的活性。

1.8 完整细胞的氧耗检测

在Oroboros 2k氧耗呼吸仪的仓中检测完整细胞的氧耗。约 5×10^6 个细胞置于TD缓冲液(37 $^{\circ}\text{C}$)中, 先记录细胞基本的氧耗水平(以Base表示)。然后加入终浓度为2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的寡霉素(oligomycin)(Sigma-Aldrich), 记录抑制ATP合酶复合体后的氧耗水平(以Oligo-resistant表示), 最后加入终浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的FCCP(Sigma-Aldrich), 记录最大氧耗水平(以FCCP表示)。用蛋白浓度进行氧耗水平的相对定量分析。

1.9 ATP含量检测

用荧光素/荧光素酶化学发光法ATP测定试剂盒(Thermo)检测细胞ATP含量。约 1×10^6 个细胞在100 μL Tris-EDTA缓冲液中煮沸90 s, 然后于4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times\text{g}$ 离心1 min。将上清液与标准反应液混合, 采用多功能酶标仪检测化学发光情况, 用ATP溶液建立标准曲线, 用蛋白浓度进行ATP含量的相对定量。除检测细胞基本的ATP含量(Base)外, 在收获细胞前加入终浓度为15 $\mu\text{g/mL}$ 的寡霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 检测抑制ATP合酶后的ATP含量(Oligo-resistant)。

1.10 ROS水平的检测

采用线粒体超氧化物指示剂MitoSOXTM红色荧光染料(Thermo)评估线粒体中ROS的产生情况。约 5×10^5 个细胞, 用5 $\mu\text{mol/L}$ MitoSOXTM在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育25 min。洗净后, 用流式细胞仪(BD Biosciences)测量5 000个细胞, 得到每个细胞的平均荧光强度(median fluorescence intensity, MFI)。

1.11 统计分析

计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用SPSS 22.0统计软件进行数据统计分析, 组间数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。首先检验方差

齐性, 如果方差齐, 则选用Tukey计算 P 值, 方差不齐则选用Tamhane's T2计算 P 值。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后能高效表达并定位于线粒体

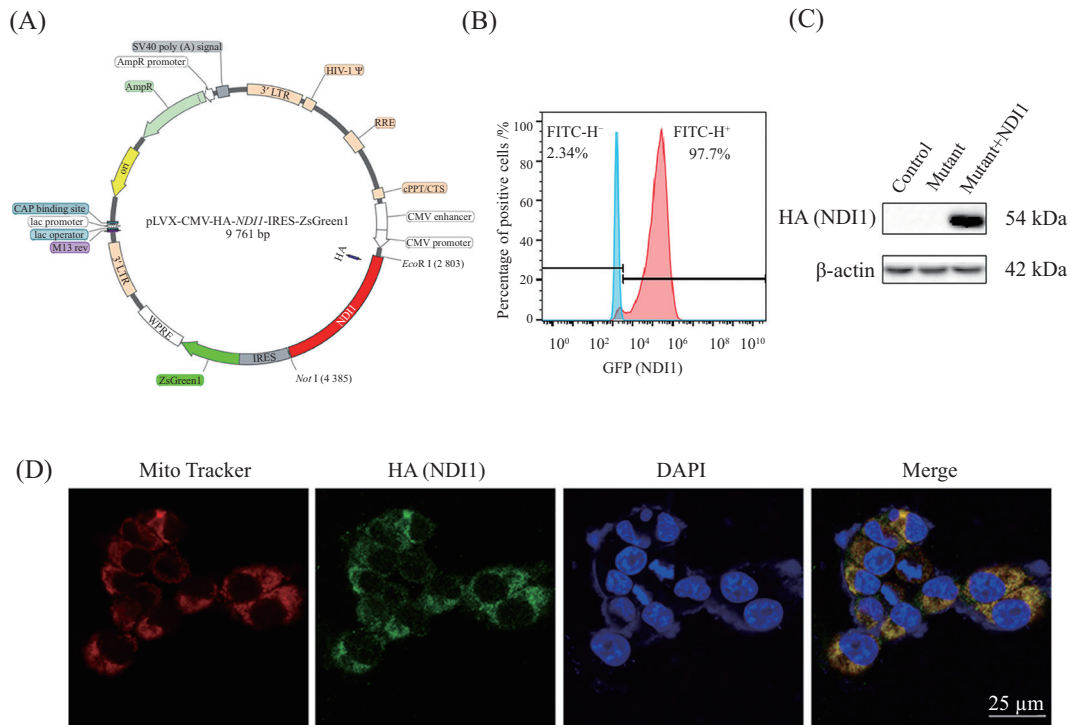
表达*NDI1*的重组慢病毒载体的结构图见图1A。*NDI1*重组慢病毒转导细胞模型后72 h, 流式细胞术检测GFP(*NDI1*)阳性细胞率达到97.7%(图1B), Western blot结果表明HA(*NDI1*)蛋白表达水平理想(图1C)。激光共聚焦显微镜检测到Mito Tracker与HA(*NDI1*)的亚细胞共定位(图1D), 表明*NDI1*蛋白能够在细胞模型中定位于线粒体。

2.2 *NDI1*可以恢复复合体I基因突变细胞模型的复合体I酶活性

突变组线粒体整体的复合体I酶活性较对照组显著下降($P < 0.001$), 突变+*NDI1*组较突变组显著升

高($P < 0.01$)且较对照组无显著差异(图2A中Base)。结果表明, 复合体I基因突变细胞模型的线粒体整体的复合体I酶活性低下, 导入*NDI1*后线粒体整体的复合体I酶活性恢复至正常水平。

鱼藤酮是哺乳动物复合体I的抑制剂。本研究所用的人细胞的内源性复合体I会被鱼藤酮抑制, 对鱼藤酮敏感, 而外源性酵母复合体I具有鱼藤酮抗性, 对鱼藤酮不敏感。本研究在用鱼藤酮处理细胞后, 测定了对鱼藤酮不敏感的复合体I酶活性(Rot-resistant)。以Base值减去Rot-resistant值为对鱼藤酮敏感的复合体I酶活性值(图2A中Rot-sensitive), 突变组对鱼藤酮敏感的复合体I酶活性较对照组显著下降($P < 0.01$), 而突变+*NDI1*组较突变组无差异, 表明突变组和突变+*NDI1*组的内源性复合体I酶活性均较低。另外, 计算对鱼藤酮不敏感的复合体I酶活性的比例(图2B), 突变组对鱼藤酮不敏感的复合体I酶活性的比例较对照组无差异, 突变+*NDI1*组较突变组显著增高($P < 0.05$), 表明在突变+*NDI1*组细胞中存

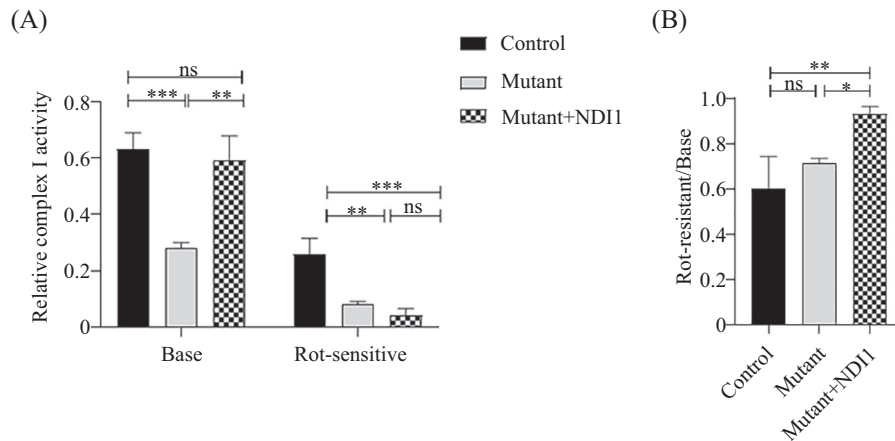


A: 表达*NDI1*的重组慢病毒载体的结构图。B: 流式细胞术检测GFP(*NDI1*)阳性细胞率。C: Western blot检测HA(*NDI1*)表达水平。D: 激光共聚焦显微镜检测Mito Tracker与HA(*NDI1*)的亚细胞共定位。其中Mito Tracker(红色)指示线粒体, HA(绿色)指示HA(*NDI1*)蛋白, DAPI(蓝色)指示细胞核。

A: the structure of the recombinant lentivirus vector to expressing *NDI1*. B: GFP (*NDI1*) positive cells detected by flow cytometry analysis. C: HA (*NDI1*) level detected by Western blot analysis. D: co-localization of Mito Tracker and HA (*NDI1*) detected by confocal microscopy. Mito Tracker (red) indicates mitochondria, HA (green) indicates HA (*NDI1*) protein, and DAPI (blue) indicates the nucleus.

图1 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后*NDI1*的表达以及亚细胞定位

Fig.1 The expression and subcellular localization of *NDI1* in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation

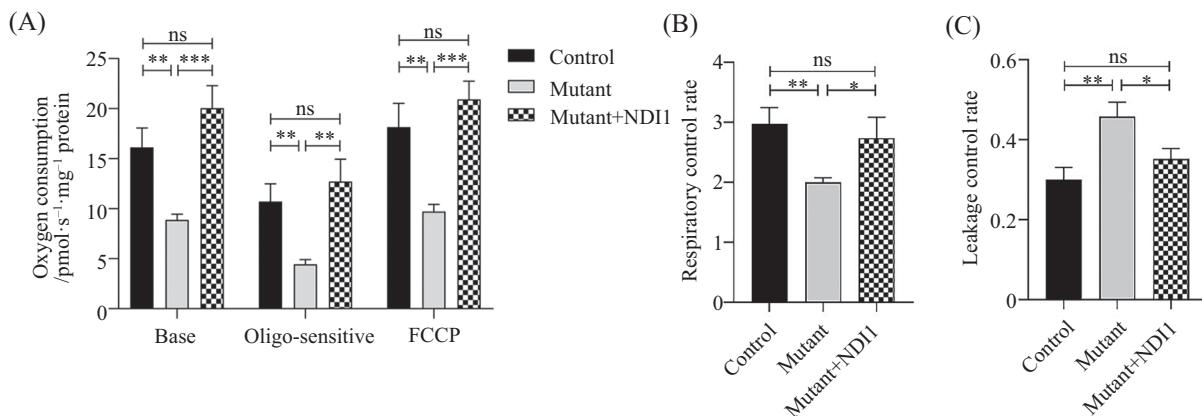


A: 线粒体整体的复合体I酶活性(Base)、对鱼藤酮敏感的复合体I酶活性(Rot-sensitive)。B: 对鱼藤酮不敏感的复合体I酶活性的比例。ns: 无显著差异, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: the overall mitochondrial complex I enzymatic activity (Base), and the rotenone sensitive complex I enzymatic activity (Rot-sensitive). B: the rotenone insensitive complex I enzymatic activity. ns: no significant difference, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图2 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后的复合体I酶活性

Fig.2 The enzymatic activity of complex I in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation



A: 细胞的基本氧耗(Base)、ATP合酶有关的氧耗(Oligo-sensitive)和最大氧耗(FCCP)。B: 细胞的呼吸控制率(RCR)。C: 细胞的泄漏控制率(LCR)。ns: 无显著差异, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: basal oxygen consumption (Base), ATP synthase-related oxygen consumption (Oligo-sensitive), and maximum oxygen consumption (FCCP). B: RCR (respiratory control rate). C: LCR (leakage control rate). ns: no significant difference, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图3 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后的氧耗水平

Fig.3 The oxygen consumption level in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation

在较多的外源性酵母复合体I(NDI1)。

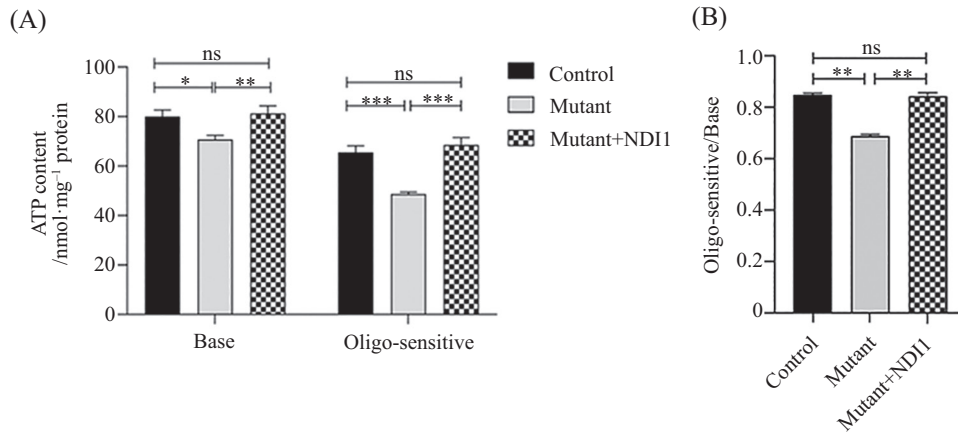
2.3 *NDI1*可以恢复复合体I基因突变细胞模型的氧耗水平

突变组细胞的基本氧耗水平较对照组显著降低($P<0.01$), 突变+NDI1组较突变组显著提高($P<0.001$)且较对照组无显著差异(图3A中Base)。

在用ATP合酶抑制剂寡霉素处理细胞后, 对Oligo-resistant氧耗进行了测定。以Base值减去Oligo-resistant值为Oligo-sensitive值, Oligo-sensitive值表示与ATP合酶有关的氧耗(图3A中Oligo-sensitive)。突

变组Oligo-sensitive氧耗较对照组显著降低($P<0.01$), 突变+NDI1组较突变组显著升高($P<0.01$)且较对照组无显著差异。

解偶联剂FCCP作为质子载体使大量质子回流(质子不再经ATP合酶回流而产生ATP), 并将氧耗提高到最大水平。FCCP处理后的最大氧耗(图3A中FCCP), 可以反映呼吸链的电子传递和质子泵的最大潜能, 突变组最大氧耗较对照组显著下降($P<0.01$), 突变+NDI1组较突变组显著升高($P<0.001$)且较对照组无显著差异。



A: 细胞的基本ATP含量、对寡霉素敏感的ATP含量。B: 对寡霉素敏感的ATP含量的比例。ns: 无显著差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the basal ATP content, and the oligomycin-sensitive ATP content. B: the ratio of oligomycin-sensitive ATP content. ns: no significant difference, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后的ATP水平

Fig.4 ATP level in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation

通过计算细胞的呼吸控制率(respiratory control rate, RCR)和泄漏控制率(leakage control rate, LCR)评估线粒体偶联效率。RCR(以 Base/Oligo-resistant 计算), 代表线粒体ATP合酶偶联效率(图3B), 突变组RCR较对照组显著降低($P < 0.01$), 突变+NDI1组较突变组显著升高($P < 0.05$)且较对照组无显著差异。LCR(以 Oligo-resistant/FCCP计算), 代表质子泄漏率(图3C), 突变组LCR较对照组显著升高($P < 0.01$), 突变+NDI1组较突变组显著降低($P < 0.05$)且较对照组无显著差异。

上述结果表明, 复合体I基因突变细胞模型的基本氧耗、线粒体相关的氧耗以及线粒体偶联效率均低下, *NDI1*的导入可以使细胞的基本氧耗、线粒体相关的氧耗以及线粒体偶联效率均恢复至正常水平。

2.4 *NDI1*可以恢复复合体I基因突变细胞模型的ATP水平

突变组细胞的基本ATP含量较对照组显著下降($P < 0.05$), 突变+NDI1组较突变组显著升高($P < 0.01$)且较对照组无显著差异(图4A中Base)。

为了研究线粒体氧化磷酸化对ATP产量的贡献程度, 以Base值减去Oligo-resistant值得出Oligo-sensitive的ATP含量。突变组对寡霉素敏感的ATP含量较对照组显著降低($P < 0.001$), 突变+NDI1组较突变组显著升高($P < 0.001$)且较对照组无显著差异(图4A中Oligo-sensitive)。突变组对寡霉素敏感的ATP含量的比例较对照组显著降低($P < 0.01$), 突变+NDI1

组较突变组显著升高($P < 0.01$)且较对照组无显著差异(图4B)。

结果表明, 复合体I基因突变细胞模型的基本ATP含量、线粒体有关的ATP含量下降, 转导*NDI1*可以恢复细胞的基本ATP含量、线粒体有关的ATP含量至正常水平。

2.5 *NDI1*可以降低复合体I基因突变细胞模型的线粒体氧化应激

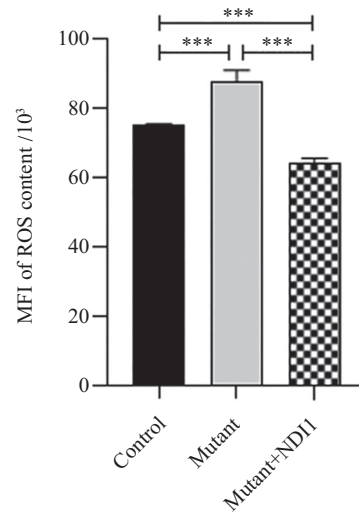
突变组线粒体中ROS水平较对照组显著升高($P < 0.001$), 突变+NDI1组较突变组显著降低($P < 0.001$)且较对照组更低($P < 0.001$)(图5)。结果表明, 复合体I基因突变细胞模型的线粒体氧化应激水平增高, *NDI1*的导入能够使线粒体氧化应激水平降低至比正常组更低的水平。

2.6 *NDI1*可以降低复合体I基因突变细胞模型的线粒体自噬水平

LC3是自噬的标志性蛋白, LC3-II占总LC3蛋白的比例越高则表示自噬水平越高。分离线粒体后提取线粒体蛋白进行Western blot(图6A)。量化后计算LC3-II比例(图6B), 突变组LC3-II比例较对照组显著增加($P < 0.05$), 突变+NDI1组较突变组、对照组均无显著差异。结果表明, 细胞模型的线粒体自噬水平增强, 转导酵母*NDI1*可以部分降低线粒体自噬水平。

3 讨论

目前针对线粒体呼吸链复合体I缺陷的非药物治

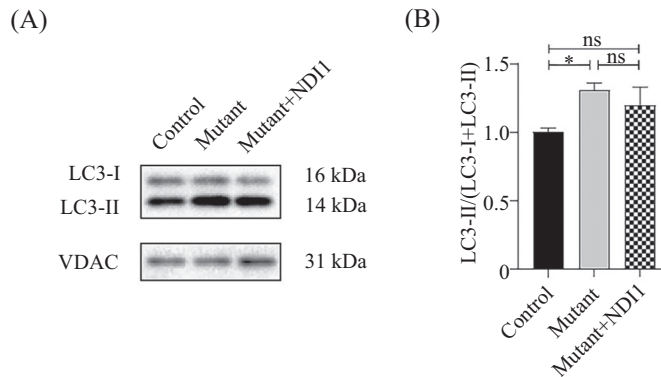


MFI: 平均荧光强度。*** $P < 0.001$ 。

MFI: mean fluorescence intensity. *** $P < 0.001$ 。

图5 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后的线粒体ROS水平

Fig.5 Mitochondrial ROS level in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation



A: Western blot检测线粒体中LC3-I、LC3-II的表达水平,以VDAC为内参。B: 线粒体中LC3-II占总LC3的比例的量化分析。ns: 无显著差异, * $P < 0.05$ 。

A: LC3-I and LC3-II levels in mitochondria were detected by Western blot, with VDAC as the internal control. B: the analysis of the proportion of LC3-II to total LC3 in mitochondria. ns: no significant difference, * $P < 0.05$ 。

图6 *NDI1*转导复合体I基因突变细胞模型后的线粒体自噬水平

Fig.6 Mitophagy level in *NDI1*-transduced cell model with complex I gene mutation

疗策略主要有3种: ①线粒体移植治疗, CHANG等^[16]将线粒体移植到源自MERRF综合征病人的成纤维细胞中,但移植效率低且线粒体不能长时间维持; ②复合体I蛋白治疗,有报道采用细胞通透性蛋白进行基础研究^[17],但尚不能做到蛋白长期有效,而且蛋白的制备纯化、稳定保存离临床治疗要求尚远; ③复合体I基因治疗, GUY的团队^[18-19]的*ND4*基因治疗Leber氏视神经病已完成临床前研究并进入临床试验阶段,还有研究采用AAV-*NDUFS4*对*NDUFS4*基因敲除的Leigh综合征小鼠模型进行基因治疗^[20-22]。以上基因治疗策略只针对人类复合体I的某一个亚基缺陷。本研究中的酵母*NDI1*基因治疗策略,可以针对人类复合体I的

任何亚基缺陷。

在酵母细胞中, *NDI1*基因带有线粒体导肽序列,位于细胞核基因组中,在细胞质中表达为*NDI1*蛋白, *NDI1*蛋白在线粒体导肽的作用下转运到线粒体基质中,然后定位于内膜上。本研究中重组慢病毒中的带有线粒体导肽序列的酵母*NDI1*基因,先进入细胞核中,然后在细胞质中表达为*NDI1*蛋白, *NDI1*蛋白被转运到线粒体中并发挥功能。另有研究表明,酵母*NDI1*在大鼠中的表达没有引起免疫反应,这可能是因为外来蛋白位于线粒体中,因此可以躲避免疫监测^[23]。

已有一些研究证实了酵母*NDI1*基因或其蛋

白产物用于治疗复合体I缺陷相关疾病的有效性。WALKER等^[24]将酵母*NDII*基因导入呼吸链复合体I组装因子缺陷的果蝇模型,结果发现果蝇复合体I缺陷表型得到部分或全部补偿,这表明酵母复合体I功能可以替代果蝇缺陷复合体I。将在体外制备的能通透进入细胞的TAT-NDII蛋白,注射至心肌缺血再灌注损伤大鼠模型的腹膜,发现其能使大鼠的心梗面积减小,进一步提取大鼠心肌细胞的线粒体,进行检测发现复合体I功能恢复,表明酵母复合体I可以替代性补偿大鼠缺陷复合体I功能^[25-26]。在肺癌细胞中,去除微丝结合蛋白fascin使线粒体的氧化磷酸化功能受损,酵母*NDII*治疗能够恢复线粒体的呼吸功能^[27]。在Multiple Sclerosis小鼠模型中,采用*NDII*基因靶向功能缺陷的复合体I能够解决轴突受损和神经元缺失问题,从而改善该小鼠模型的视觉功能^[14]。本研究针对线粒体复合体I基因突变的Leigh综合征细胞模型的基因治疗结果表明,转导*NDII*基因可以恢复该细胞模型的复合体I酶活性(外源酵母复合体I的补偿)、线粒体有关的氧耗水平、线粒体偶联效率、线粒体有关的ATP水平(图2~图4),并且可以降低该细胞模型的线粒体氧化应激水平、线粒体自噬水平(图5和图6)。

Leigh综合征致病机制主要是线粒体复合体I的基因突变^[5],涉及线粒体基因组^[4,6]和细胞核基因组^[7-11]的一系列基因突变。线粒体基因组突变中,绝大部分(81.8%)是ND系列基因的突变^[6]。近年有研究采用转导AAV-*NDUFS4*的方法对*NDUFS4*基因敲除的Leigh综合征小鼠模型进行基因治疗,结果发现转导AAV-*NDUFS4*具有一定的疗效^[20-22]。至今未见针对Leigh综合征的复合体I的线粒体基因组突变的基因治疗,本研究针对*NDI*基因突变的基因治疗研究具有独特创新和意义。由于线粒体基因组的特殊性,至今未见成功建立线粒体基因组突变的Leigh综合征动物模型,本研究尚未基于*NDI*基因突变的动物模型进行基因治疗研究。本研究的酵母*NDII*基因治疗可以应用于复合体I的线粒体编码亚基、细胞核编码亚基及组装因子具有缺陷的Leigh综合征,且具有较好的推广应用价值。

参考文献 (References)

- [1] LENZA G, GENOVA M L. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old

- subject [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(8): 961-1008.
- [2] FATO R, BERGAMINI C, LEONI S, et al. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(12): 2487-501.
- [3] KIM I, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, LEMASTERS J J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 462(2): 245-53.
- [4] NEGISHI Y, HATTORI A, TAKESHITA E, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome [J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(7): 405-7.
- [5] CHANG X, WU Y, ZHOU J, et al. A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations [J]. *Medicine*, 2020, 99(5): e18634.
- [6] LEE J S, KIM H, LIM B C, et al. Leigh syndrome in childhood: neurologic progression and functional outcome [J]. *J Clin Neurol*, 2016, 12(2): 181-7.
- [7] LOU X, SHI H, WEN S, et al. A novel *NDUFS3* mutation in a Chinese patient with severe Leigh syndrome [J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(12): 1269-72.
- [8] DANG Q L, PHAN D H, JOHNSON A N, et al. Analysis of human mutations in the supernumerary subunits of complex I [J]. *Life*, 2020, 10(11): 296.
- [9] REINSON K, OUNAP K. Complex I deficiency and Leigh syndrome through the eyes of a clinician [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(11): e13187.
- [10] EI-DESOUKY S, TAALAB Y M, EI-GAMAL M, et al. Animal model for Leigh syndrome [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2011: 451-64.
- [11] RAHMAN S, THORBURN D. Nuclear gene-encoded Leigh syndrome spectrum overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*, 2nd ed [M]. Seattle: University of Washington, 2020.
- [12] SPANGENBERG L, GRANA M, GREIF G, et al. 3697G>A in *MT-ND1* is a causative mutation in mitochondrial disease [J]. *Mitochondrion*, 2016, 28: 54-9.
- [13] SUN D, LI B, QIU R, et al. Cell type-specific modulation of respiratory chain supercomplex organization [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 926.
- [14] TALLA V, KOILKONDA R, GUY J. Gene therapy with single-subunit yeast NADH-ubiquinone oxidoreductase (*NDI1*) improves the visual function in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice model of multiple sclerosis (MS) [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(4): 1952-65.
- [15] YUAN W, CHEN J, CAO Y, et al. Comparative analysis and optimization of protocols for producing recombinant lentivirus carrying the anti-Her2 chimeric antigen receptor gene [J]. *J Gene Med*, 2018, 20(7/8): e3027.
- [16] CHANG J C, LIU K H, CHUANG C S, et al. Treatment of human cells derived from MERRF syndrome by peptide-mediated mitochondrial delivery [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(12): 1580-96.
- [17] PEPE S, MENTZER R M, Jr, GOTTLIEB R A. Cell-permeable protein therapy for complex I dysfunction [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2014, 46(4): 337-45.
- [18] YU H, KOILKONDA R D, CHOU T H, et al. Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model [J].

- Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(20): E1238-47.
- [19] KOILKONDA R D, YU H, CHOU T H, et al. Safety and effects of the vector for the Leber hereditary optic neuropathy gene therapy clinical trial [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132(4): 409-20.
- [20] VAN DE WAL M A E, ADJOBO-HERMANS M J W, KEIJER J, et al. Ndufs4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention [J]. *Brain*, 2022, 145(1): 45-63.
- [21] REYNAUD-DULAURIER R, BENEGLIAMO G, MARROCCO E, et al. Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome [J]. *Brain*, 2020, 143(6): 1686-96.
- [22] CORRA S, CERUTTI R, BALMACEDA V, et al. Double administration of self-complementary AAV9NDUFS4 prevents Leigh disease in Ndufs4^{-/-} mice [J]. *Brain*, 2022, 145(10): 3405-14.
- [23] MARELLA M, SEO B B, FLOTTE T R, et al. No immune responses by the expression of the yeast Ndi1 protein in rats [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25910.
- [24] CHO J, HUR J H, GRANIEL J, et al. Expression of yeast NDII rescues a *Drosophila* complex I assembly defect [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50644.
- [25] MENTZER R M, Jr, WIDER J, PERRY C N, et al. Reduction of infarct size by the therapeutic protein TAT-Ndi1 *in vivo* [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2014, 19(3): 315-20.
- [26] FORTE M, PALMERIO S, BIANCHI F, et al. Mitochondrial complex I deficiency and cardiovascular diseases: current evidence and future directions [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(5): 579-91.
- [27] LIN S, HUANG C, GUNDA V, et al. Fascin controls metastatic colonization and mitochondrial oxidative phosphorylation by remodeling mitochondrial actin filaments [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(11): 2824-36, e8.