技术方法

文章编号:1000-5404(2005)06-0567-02

线粒体DNA缺失细胞系的建立

Establishment of mitochondrial DNA-depleted cell lines

戴纪刚[1],闵家新[1],张国强[1],吴秋平[1],周人杰[1],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]新桥医院胸外科,重庆 400037,[2]实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 线粒体DNA缺失细胞系的建立和鉴定。**方法** 利用EB可以插入无核蛋白保护的线粒体DNA分子层状排列的碱基对之间抑制mtDNA复制的特点,将Lewis肺癌细胞在含有低剂量的EB、丙酮酸钠、尿嘧啶的培养液长期培养。**结果** 经EB诱导,可培育出具有嘧啶依赖性的mtDNA缺失细胞系。**结论** 线粒体DNA缺失细胞系的建立,为进一步研究线粒体DNA分子的基因及功能提供了条件。

闭环双链的线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)被广泛应用于研究动物的遗传进化、种群分化以及包括肿瘤在内的多种与mtDNA相关的疾病[1,2]。线粒体DNA缺失细胞系,即这种细胞系无线粒体DNA,无二氢乳氢酸脱氢酶活性,具有嘧啶和丙酮酸依赖性,并且能够接受外源性线粒体DNA发挥作用。这种细胞系,为研究相同的核遗传背景下不同线粒体DNA分子的基因及功能,研究核与线粒体基因组的相互作用以及线粒体DNA突变的分子致病机制等方面提供了条件。本研究参照文献[3],以Lewis肺癌细胞系为母株,建立了线粒体DNA缺失细胞系(mtDNA-less cell lines)。

1 材料与方法

1.1 主要材料

含高糖(4.5 mg/ml)的DMEM及胎牛血清为Gibico公司产品,溴化乙啶(ethidium bromide, EB)、尿嘧啶及丙酮酸钠为美国Sigma公司产品,德国Heraeus孵育箱,Lewis肺癌细胞系由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 线粒体DNA缺失细胞系的建立

将Lewis肺癌细胞培养于含50 ng/ml EB、110 μg/ml丙酮酸钠、50 μg/ml尿嘧啶、10%胎牛血清及4.5 mg/ml葡萄糖的DMEM培养基中,细胞培养于37 ℃,含5% CO_2 的孵育箱中,每2~3天换液1次,每周传代1~2次。30 d后换用不含EB的培养液继续培养,有限稀释法进行克隆化,挑选其中1个克隆扩增培养。

1.3 无mtDNA的细胞系鉴定

1.3.1 生长缺陷的鉴定 将经EB处理30 d后的Lewis肺癌细胞换用含10%胎牛血清及高糖DMEM的选择培养基中培养(不含丙酮酸钠和尿嘧啶),每2~4天换液1次,同批非选择培养的Lewis肺癌细胞作对照,观察细胞生长、形态及死亡情况。采用台盼蓝排除法鉴定活细胞。

1.3.2 PCR检测 按常规酶解法提取总DNA[4]。取0.5 μg总DNA作PCR模板。分别以正常和EB处理过的Lewis肺癌细胞的总DNA为模板,扩增定位于线粒体DNA和核DNA上的两个目的基因片段。线粒体DNA特异引物P1:5′-ATAAACATTACTCTGGTCTTGTAAACC-3′,P2:5′-ATTAATTTAAAGGCCAG GACCAAACCT-3′,预期扩增产物为1 100 bp。核DNA脂蛋白脂酶基因特异引物,P3:5′-ACAGAGAAACCCTGTCTCGG-3′,P4:5′-GTATATCCCTTGACTCTTTC-3′,预期扩增产物为534 bp。引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成。PCR反应各成分及循环参数:建立100 μl反应体系,先经94 ℃变性5 min,加入1 μl(4 U/μl)的Taq酶循环30个周期(每个周期94 ℃ 30 s、55 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min),最终72 ℃延长10 min。扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳分析,电泳液为TBE缓冲液,以3 V/cm电泳1~2 h,紫外灯下观察并拍照。

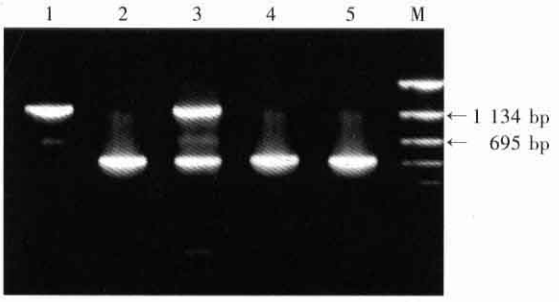
2 结果

在含有EB、丙酮酸钠及尿嘧啶的培养液中,Lewis肺癌细胞生长较为迅速,平均每4天即可传代,形态呈梭形及多角形。培养30 d后,换用不含丙酮酸钠和尿嘧啶的选择培养基,从第1天开始细胞逐渐悬浮、肿胀,培养2~3 d以后细胞大量悬浮死亡。应用台盼蓝排除法鉴定活细胞:2%台盼蓝生理盐水溶液染色后,可以观察到在选择培养第6天已无活细胞存在。这种嘧啶和丙酮酸依赖性说明,EB处理组细胞总DNA中缺乏mtDNA。PCR结果显示,以未经EB处理的细胞总DNA作为模板,既可扩增出定位于mtDNA的1 100 bp片段,也可扩增出定位于核DNA上的脂蛋白脂酶基因534 bp片段。而经EB处理组则只能扩增出定位于核DNA的534 bp片段(图1),进一步证实了EB处理组细胞中mtDNA的缺失。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900173),第三军医大学校科研基金资助(2002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900173) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002)

作者简介:戴纪刚(1971-),男,湖南省双峰县人,博士,主治医师,主要从事肿瘤遗传学方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68774616,E-mail:Daijigang@vip.sina.com

收稿日期:2003-12-22;修回日期:2004-08-19



1：对照组，引物 P1-P2；2：对照组，引物 P3-P4；3：对照组，引物 P1-P2 加 P3-P4；4：EB 处理组，引物 P3-P4；5：EB 处理组，引物 P1-P2 和 P3-P4；M：DNA Markers

图 1　PCR 产物电泳分析

3　讨论

EB(ethidium bromide，EB)是一种 DNA 分子螯合剂，其扁平状的分子可以插入无核蛋白保护的线粒体 DNA 分子层状排列的碱基对之间，从而抑制 mtDNA 的复制。培养液中低剂量的 EB 即可导致人类细胞内的 mtDNA 分子完全缺失，导致细胞内有线粒体但无线粒体 DNA。线粒体 DNA 的缺失使线粒体 DNA 编码的呼吸链必需的蛋白质缺如而导致呼吸链功能受损，细胞通过 ATP/ADP 转位酶、糖酵解途径产生的能量来维持生长需要。同时由于线粒体电子链完整性受到破坏，波及到参与嘧啶合成的二氢乳氢酸脱氢酵活性，影响嘧啶核苷酸的生物合成，因而 mtDNA 缺失的细胞系存在着外源的嘧啶依赖性[5]。线粒体 DNA 缺失细胞系在一些线粒体相关疾病的研究中目前已得到广泛应用。20 世纪 80 年代末期，美国 King 等首次应用骨肉瘤细胞，经 EB 诱导，建立了线粒体 DNA 缺失细胞系，随后人肺癌细胞、HeLa 及成纤维细胞等相继被用于建立线粒体 DNA 缺失细胞[6]。我们以 Lewis 肺癌细胞系为母株，建立了线粒体 DNA 缺失的细胞系。线粒体 DNA 缺失细胞的嘧啶依赖性是判断细胞中是否存在线粒体 DNA 比较敏感可倍的指标。本实验中，EB 处理后的肺癌细胞系，经选择培养(无丙酮酸钠和尿嘧啶)2～3 d 以后大量悬浮死亡。这说明 EB 处理组细胞具有嘧啶和丙酮酸依赖性。PCR 检测也证实了细胞中线粒体 DNA 的缺失。该细胞系的建立，为进一步研究奠定了基础。

关键词：线粒体 DNA 缺失；细胞系；肺癌
中图法分类号：Q813.1　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Poulton J, Macaulay V, Marchington D R. Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked[J]? Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 752－757.
[2] 戴纪刚，张国强，魏　泓，等. 线粒体 DNA 与肿瘤[J]. 第三军医大学学报，1999，21(9)：691－693.
[3] King M P, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation[J]. Science, 1989, 246(4929): 500－503.
[4] 金冬雁，黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学技术出版社，1992. 464.
[5] King M P, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA[J]. Methods Enzymol, 1996, 264: 304－313.
[6] Bodnar A G, Cooper J M, Holt I J, *et al*. Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion [J]. Am J Hum Genet, 1993, 53(3): 663－669.

(编辑　张大春)

(上接 559 页)

2　结果与讨论

本次调查 1 238 人，各种眼疾病人 362 例，患病率为 29.24%，其中白内障患者 98 例占 7.9%；沙眼患者 55 例占 4.4%；角膜病患者 29 人占 2.3%；糖尿病眼底病变 20 例占 1.6%；青光眼患者 19 例占 1.5%；老年相关性黄斑变性 11 例占 0.9%；眼外伤 3 例占 0.2%；其他眼疾患者 127 例占 10.2%。

各眼病与性别的关系：各种眼病与性别的关系分析，P 值均 >0.05，男女患病无显著性差异。

白内障居该地区致盲眼病患病率之首，与全国及其它地区的报道一致[1,2]，因而加大白内障防治工作力度是降低盲率，实现防盲规划的关键所在。与白内障发病相关的因素包括：年龄、收入水平、文化程度、有无高血压、糖尿病、高血脂(P 值均 <0.05)。经多因素 logistic 回归分析($\alpha=0.05$)，年龄因素与白内障发病有关，且危险性最大($OR=11.781$)。

本次调查人群中沙眼及角膜病患病率较高，分别为 4.4% 和 2.3%，从单因素及多因素分析来看，沙眼的发病与卫生条件、文化程度(OR 值分别为 0.220、0.758)有关，居民文化程度越高、卫生条件越好其发病率越低。其它眼病在多因素分析中无统计学意义的影响因素存在，仅在单因素分析时有其影响因素；糖尿病性眼底病变与患糖尿病有非常显著性差异($P<0.01$，$OR=41.07$)。此外高血脂、年龄、家族史等也为此病发病的有关因素。

关键词：眼病；流行病学
中图法分类号：R195.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 张士元. 我国白内障的流行病学调查资料分析[J]. 中华眼科杂志，1999，35(6)：336－340.
[2] Newland H S, Hiller J E, Casson R J, *et al*. Prevalence and causes of blindness in the South Australian population aged 50 and over[J]. Ophthalmic Epidemiol, 1996, 3(1): 97－107.

(编辑　栗　嘉)