DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.034
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2245-03

综述

RHO^0 细胞的培养和应用

RHO^0 cell: isolation and application

徐世伟 综述,汪仕良 审校 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

RHO^0 细胞是指一类线粒体内 DNA 缺失,无线粒体功能,依靠糖酵解存活的细胞系。因为没有线粒体功能这种特殊性,使这类细胞在线粒体 DNA、线粒体功能、线粒体遗传及线粒体与缺氧、疾病、长寿、损害等的研究中有广泛应用。国内对这类细胞的研究和应用还较少,本研究回顾了这类细胞的培养和应用方面的文献。

1 mtDNA 的结构和功能

线粒体是细胞能量的主要来源,线粒体功能的正常发挥关系到细胞的存活、增殖及正常功能的维持。线粒体又不同于其他细胞器,有自己的 DNA,即 mtDNA,近年来研究再次认识到线粒体及 mtDNA 编码产物的重要生物学功能,mtDNA 编码的基因产物参与线粒体呼吸并可调节细胞凋亡等细胞功能。

哺乳动物基因组由核 DNA 即 nDNA 和线粒体 DNA 即 mtDNA 构成。哺乳动物 mtDNA 是长度为 16.5 kb 左右的共价闭合双链 DNA。mtDNA 是核外遗传物质,近几年已测定 mtDNA 控制区 5′-端、3′-端和全序列,并按线粒体 DNA 物理结构将其分为编码区和非编码区。mtDNA 含有 37 个基因,其中 13 个蛋白质基因与线粒体氧化磷酸化有关。2 个 rRNA 基因,分别编码 12SrRNA 和 16SrRNA,剩余 22 个 tRNA 基因,分别编码 20 种 tRNA[1~3]。mtDNA 转录的一条 mRNA 链上同时含有 13 种肽和 tRNA 的 mRNA 并可同时翻译,因此它们的表达不需其它特异性因子协调。线粒体基因编码的蛋白均参与线粒体的氧化过程。线粒体氧化过程的重要性在于:产生能量、产生活性氧(ROS)及调节细胞凋亡。在线粒体的氧化过程中,产生于辅酶Ⅰ(NAD+)的电子经还原辅酶Ⅰ(NADH)脱氢酶传递给辅酶 Q,然后和产生于三羧酸循环的电子一起传递给细胞色素 C,再到细胞色素 C 氧化酶,最终形成水[4]。

mtDNA 有如下特点:①各基因排列紧密,几乎全部转录,一个基因执行多个功能,无内含子;②为双链环状分子,重链和轻链均有编码功能;③mtDNA 缺乏完整的修复系统,呈裸露状态,无组蛋白保护,复制时不对称,复制频率较高,又处在高氧化还原环境中,所以 mtDNA 比 nDNA 突变率高 5~17 倍;④mtDNA 主要呈母系遗传,父亲的遗传对形成子代的 mtDNA 个体特异性有一定影响,因受精过程中仅精子核与卵子融合,所以受精卵中的线粒体得到的是卵子中的 mtDNA。RHO^0 细胞的培养也正是利用了 mtDNA 的特点,逐渐将细胞线粒体的 DNA 减少以至达到无 mtDNA,生成无线粒体功能的 RHO^0 细胞。

2 RHO^0 细胞的培养

mtDNA 被发现后,也逐渐发现了由于 mtDNA 缺陷和突变所导致的疾病和损害。1968 年 Slonimski 等发现溴化乙啶(Ethidium bromide)可诱导酿酒酵母产生呼吸链缺陷的小细胞表形,随后的一系列研究表明溴化乙啶有使酵母细胞和哺乳类细胞 mtDNA 部分到完全缺失的作用。King 等[5] 应用添加微量染料溴化乙啶的培养基持续培养 143B 获得了无 mtDNA 的 RHO^0 细胞。随后对 RHO^0 细胞的培养和研究进行了总结。溴化乙啶可以与 mtDNA 的双链较牢固结合,抑制细胞分裂时的 mtDNA 的复制,使细胞分裂和线粒体复制分裂后 mtDNA 数量减少 1/2,逐次减少,数量表示为原来数量的 $1/2^n$,对于细胞线粒体内有限的 mtDNA 拷贝,当分裂次数 n 足够时大时,数量的 $1/2^n$ 将小于 1 或更小,即细胞线粒体内没有有效的 mtDNA。对于线粒体平均 10 000 个 DNA 分子,计算可知,分裂 14 代后,线粒体内 DNA 数量将为 $10\,000/2^{14}$,即 0.6 个。继续培养,既可以清除所有 mtDNA[6]。

由线粒体结构和 mtDNA 功能可知,无 mtDNA 的线粒体,由于部分呼吸链的蛋白不能合成,导致呼吸链功能的丧失,线粒体失去氧化磷酸化功能。酵母细胞可利用糖酵解,分解糖类获得能量,而哺乳动物细胞则因为糖酵解不能有效进行,能量缺乏死亡。随后发现在给予尿嘧啶和丙酮酸后,线粒体无功能的(无 mtDNA)细胞仍可以接近正常的速度分裂增殖。Gregoire 等研究表明尿嘧啶合成需要的二氢乳清酸酶脱氢酶位于线粒体内膜,且酶的功能需要功能正常的呼吸链的电子传递。King[5] 也在其实验中明确了 140B206 细胞在溴化乙啶存在时存活和生长对尿嘧啶的依赖。因为没有正常的线粒体呼吸链功能,使得细胞质内产生的原来通过细胞质-线粒体穿梭系统氧化的 NADH 的氧化受到抑制,通过 NAD 关联的乳酸脱氢酶作用丙酮酸到乳酸的还原,可氧化细胞质内过多的 NADH。在正常细胞,丙酮酸可通过三羧酸循环获得,而线粒体缺陷的细胞则需要补充。以后的实验也同样证明了这一点。由于细胞核的染色质等的 DNA 有核蛋白的保护,溴化乙啶对其影响较小。细胞核的 DNA 量和质没有明显改变,细胞核的遗传特性没有改变。

培养中注意试剂的浓度和有效期、细胞分离纯化、细胞鉴定。溴化乙啶可与滤膜结合而损失,试剂中溴化乙啶需使用 10 mg/ml 浓度进行超滤,以保证超虑后的有效浓度准确,然后再稀

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202)
作者简介:徐世伟(1964-),男,吉林省集安市人,博士,主治医师,主要从事创伤后营养代谢和早期损害方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68754347
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-10-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

释。尿嘧啶和丙酮酸在使用中也需要注意低温和有效期。细胞可通过低密度稀释法来分离明确的 RHO^0 细胞。鱼藤酮和抗霉素A可有效抑制呼吸链,可有效杀死依靠呼吸链提供能量的细胞,依靠糖酵解提供能量细胞可以存活,也是一种可选分离的方法。细胞的鉴定须通过细胞线粒体的功能如耗氧、呼吸控制率、线粒体膜电位、细胞色素C氧化酶功能、mtDNA的含量(直接测定、RT-PCR)等方法,使用无尿嘧啶和丙酮酸的培养基也可做初步的鉴定。目前已有多种细胞可培养成 RHO^0 细胞,包括143B、GM701、Hela、A549等细胞系或其亚型,较多是肿瘤细胞。但由于细胞的特性不同,一些细胞系可快速恢复其mtDNA,表现为对这些药物的抗性;另一些细胞系不能耐受EB,很快死亡。许多细胞系不能通过此方法培育成 RHO^0 细胞。笔者使用此法培养鼠BRL、IEC6细胞系等均不能获得 RHO^0 细胞,Inoue等也有类似的发现。King[6]有一简单方法,可较快鉴别细胞系能否培养成 RHO^0 细胞:应用去除嘧啶的血清和50 ng/ml溴化乙啶,在加或不加50 μg/ml尿嘧啶的高糖培养基,培养细胞。如果细胞在无尿嘧啶的培养基中死亡,而在有尿嘧啶的培养基中正常生长,则该细胞具有较强的培养成 RHO^0 细胞的潜力;如果两种培养基中细胞均正常生长,则该细胞可能对药物有耐性,不能失去mtDNA,很难培养成 RHO^0 细胞;如果两种培养基中细胞均死亡,也不可能培养成 RHO^0 细胞。

Inoue等[7]应用相似原理,使用抗癌药物ditercalinium(地特铵)将鼠细胞系培养成为 RHO^0 细胞。RHO^0 细胞地培养虽然已有较多的成功例子和对其的解释,对于其中的耐受和无效的原因尚未能真正了解,有待以后的研究。最近Jazayeri等[8]利用含有编码无活性DNA多聚酶-gama的质粒转染HEK293细胞,诱导表达后,使细胞线粒体DNA迅速减少,20 d内可以将母代细胞转变为 RHO^0 细胞,为 RHO^0 细胞的培养又增加了新的方法。

3 RHO^0 细胞的应用

RHO^0 细胞研究较多,有很大一部分是应用酵母细胞研究相关的细胞性质,由于酵母细胞有其自身的特性,与哺乳类细胞在代谢等方面有很大差距,我们这里只回顾了哺乳类细胞方面的应用。

3.1 细胞融合研究

细胞融合是一个重要的研究手段,可以将不同性质的细胞融合,如无核细胞和有核细胞融合,研究蛋白和核基因的性质和关系。Bodnar AG首先进行了 RHO^0 细胞的融合实验,他们获得新生先天性线粒体缺陷的婴儿的皮肤纤维母细胞,此细胞只能在丙酮酸和尿嘧啶存在时存活,Southern blot和PCR分析表明,该细胞仅含有正常细胞的2%的mtDNA,而其呼吸链的酶的活性也极低。通过将该细胞与人源的 RHO^0 细胞(A549.B2细胞系)融合,发现该细胞可以恢复mtDNA和线粒体呼吸链的功能,表明核基因组对线粒体基因组有控制作用。

在另一种线粒体病,线粒体的细胞色素C氧化酶和琥珀酸脱氢酶活性缺失。将由病人获取的533纤维母细胞(细胞色素C氧化酶和琥珀酸脱氢酶活性缺失),与 RHO^0 Hela细胞融合,结果此两种酶的活性恢复,表明该酶的缺陷是由于核基因的异常引起[9]。也有通过利用 RHO^0 细胞与线粒体缺陷细胞进行细胞融合,研究细胞的能量代谢与和线粒体DNA的关系[10]。

通过细胞融合研究核基因和线粒体基因的关系,表明核基因和线粒体基因需协同作用才能合成完整呼吸链[11]。

Alzheimer病脑细胞与Hela(RHO^0)细胞融合,结果表明,融合细胞具有正常的细胞线粒体功能和酶的活性,且Alzheimer病的线粒体DNA突变在融和细胞中也没有表现[12]。进行家族性心室肥大性心肌病成纤维细胞与 RHO^0 骨髓瘤细胞融合实验表明,线粒体中mtDNA的T9997C的突变是引起线粒体呼吸链功能缺失的主要原因[13]。帕金森病细胞与 RHO^0 细胞融合,研究mtDNA与其细胞功能的关系[14]。

3.2 缺氧感受和细胞调节研究中的应用

应用 RHO^0 细胞研究线粒体在缺氧反应和Hif-1诱导中的作用,在缺氧时和 $CoCl_2$ 处理时,RHO+细胞的活性氧增加,并表现有Hif-1和红细胞生成素、糖酵解酶和血管内皮生只因子的增加,而 RHO^0 细胞仅当 $CoCl_2$ 处理时才活性氧产生增加,对缺氧没有反应,同样使用抗氧化剂时两种细胞的反应均被减弱,表明线粒体呼吸链是缺氧时产生活性氧的主要场所,是缺氧感受的一条途径[16]。利用 RHO^0 细胞在缺氧和正常情况下,检测细胞Hif-1表达情况,结果发现,与正常细胞无明显差别[17]。在 RHO^0 细胞活性氧、NF-kappaB增加时,核呼吸因子-1(NRF-1)和线粒体转录因子A的mRNA均增高,表明线粒体的活性氧是线粒体和细胞核之间的信号转导的一部分[18]。研究 RHO^0 细胞和其母代细胞的耗氧变化,表明 RHO^0 细胞明显耗氧减低,但对氢氰酸盐只有野生型降低,另一种阻断剂PCMB(P-chloromercurobenzoate)二者均降低,活性氧产生也有所不同,表明活性氧产生至少部分与呼吸链有关[19]。

3.3 线粒体在肿瘤药物治中的作用的研究

在癌治疗研究中,光敏硼卟啉时定位在细胞线粒体,在光照时可对细胞造成损害。对 RHO^0 细胞和含有正常mtDNA的细胞使用此类药物时,可以发现,其作用就是通过对线粒体的损害来达到治疗效果,对 RHO^0 细胞没有毒性作用[15]。利用 RHO^0 细胞研究发现线粒体呼吸链功能缺失可影响细胞凋亡[20]。抗癌药物BMD188对前列腺癌细胞的作用部分时通过线粒体的活性氧增加其作用,RHO^0 细胞对该抗癌药物有明显的抵抗作用[21]。RHO^0 细胞对阿霉素与光动力疗法不敏感,而烷化剂对RHO+细胞和 RHO^0 细胞的作用相差不大,说明了两种药物的作用机制[22]。抗癌药在 RHO^0 细胞和RHO+细胞中的作用的不同,为癌症治疗研究的深入提供依据[23]。对有些细胞的放射疗法中,RHO^0 细胞完全不敏感,mtDNA和线粒体的损害在放疗中起关键作用[24]。

关键词:RHO^0 细胞;线粒体 DNA
中图法分类号:R329.24 文献标识码:A

参考文献:

[1] Mackays S L, Olivor P D, Laipis P J, *et al*. Template-directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6(4): 1261-1267.

[2] Ghivizzani S C, Mackay S L, Madsen C S, *et al*. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region [J]. J Mol Evol, 1993, 37(1): 36-37.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] Takeda K, Onishi A, Ishida N, *et al*. SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism[J]. Anim Genet, 1995, 26(5): 321—326.

[4] Dimauro S, Bonilla E, Davidson M, *et al*. Mitochondria in neuromuscular disorders[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1366(1—2): 199—210.

[5] King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation[J]. Science, 1989, 246(4929): 500—503.

[6] King M P, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA[J]. Methods Enzymol, 1996, 264: 304—313.

[7] Inoue K, Ito S, Takai D, *et al*. Isolation of mitochondrial DNA—less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations[J]. J Biol Chem, 1997, 272(24): 15510—15515.

[8] Jazayeri M, Andreyev A, Will Y, *et al*. Inducible expression of a dominant negative DNA polymerase-gamma depletes mitochondrial DNA and produces a rho0 phenotype[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 9823—9830.

[9] Isobe K, Kishino S, Inoue K, *et al*. Identification of inheritance modes of mitochondrial diseases by introduction of pure nuclei from mtDNA-less HeLa cells to patient-derived fibroblasts[J]. J Biol Chem, 1997, 272(19): 12606—12610.

[10] Porteous W K, James A M, Sheard P W, *et al*. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion[J]. Eur J Biochem, 1998, 257(1): 192—201.

[11] McKenzie M, Chiotis M, Pinkert C A, *et al*. Functional respiratory chain analyses in murid xenomitochondrial cybrids expose coevolutionary constraints of cytochrome b and nuclear subunits of complex III[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(7): 1117—1124.

[12] Ito S, Ohta S, Nishimaki K, *et al*. Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(5): 2099—2103.

[13] Raha S, Merante F, Shoubridge E, *et al*. Repopulation of rho0 cells with mitochondria from a patient with a mitochondrial DNA point mutation in tRNA(Gly) results in respiratory chain dysfunction[J]. Hum Mutat, 1999, 13(3): 245—254.

[14] Aoki Y, Chen C S, Nakada K, *et al*. Cytoplasmic transfer of platelet mtDNA from elderly patients with Parkinson's disease to mtDNA—less HeLa cells restores complete mitochondrial respiratory function[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(1): 265—273.

[15] Munday A D, Sriratana A, Hill J S, *et al*. Mitochondria are the functional intracellular target for a photosensitizing boronated porphyrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 27, 1311(1): 1—4.

[16] Chandel N S, Maltepe E, Goldwasser E, *et al*. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(20): 11715—11720.

[17] Vaux E C, Metzen E, Yeates K M, *et al*. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain[J]. Blood, 2001, 98(2): 296—302.

[18] Morais Cardoso S, Swerdlow R H, Oliveira C R. Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid beta 25~35 requires functional mitochondria[J]. Brain Res, 2002, 931(2): 117—125.

[19] Shen J, Khan N, Lewis L D, *et al*. Oxygen consumption rates and oxygen concentration in molt-4 cells and their mtDNA depleted (rho0) mutants [J]. Biophys J, 2003, 84(2 Pt 1): 1291—1298.

[20] Miranda S, Foncea R, Guerrero J, *et al*. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(1): 44—49.

[21] Joshi B, Li L, Taffe B G, *et al*. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain[J]. Cancer Res, 1999, 59(17): 4343—4355.

[22] Singh K K, Russell J, Sigala B, *et al*. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents[J]. Oncogene, 1999, 18(48): 6641—6646.

[23] Cai J, Wallace D C, Zhivotovsky B, *et al*. Separation of cytochrome c-dependent caspase activation from thiol-disulfide redox change in cells lacking mitochondrial DNA[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(3—4): 334—342.

[24] Yoshida K, Yamazaki H, Ozeki S, *et al*. Role of mitochondrial DNA in radiation exposure[J]. Radiat Med, 2000, 18(2): 87—91.

（编辑　张　宁）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或’95 年；1953—1958 年不能写成 1953—58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“:”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、约数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2 431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net