

线粒体遗传疾病细胞模型的构建: 永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系

孙吉吉, 赵晓旭, 乔丽华, 梅霜, 聂志鹏, 张青海, 冀延春, 蒋萍萍, 管敏鑫

浙江大学遗传学研究所, 浙江大学医学院医学遗传学系, 杭州 310058

摘要: 线粒体基因组突变会引发多种线粒体遗传疾病。永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系是线粒体遗传疾病研究的重要工具之一。永生淋巴细胞系使特殊遗传信息在细胞水平得以永久保存。转线粒体细胞系技术的发展为线粒体遗传疾病的分子机制研究提供了体外细胞平台。早期转线粒体细胞系的胞质供体直接来源于未进行永生化的患者各组织细胞或血小板。本文结合永生化手段, 以线粒体 4401A>G 为例, 详细介绍了从冻存全血构建永生化淋巴细胞, 然后再与 ρ^0 206 一起构建转线粒体细胞系的原理、方法和技术路线, 并将两种细胞模型的构建归纳为 4 个步骤: (1)永生淋巴细胞构建; (2)转化; (3)筛选; (4)鉴定。为真实反应线粒体突变的功能, 本文对构建的永生淋巴系和转线粒体细胞系的线粒体突变位点、拷贝数以及转线粒体细胞系的细胞核型进行了分析与鉴定, 选取了各参数一致的细胞系用于贮存与分析, 以减少实验误差对后续突变位点功能研究的影响。两种细胞模型在细胞水平上为诠释线粒体遗传疾病的分子机制发挥了重要作用, 但在具体应用中需注意它们的局限性, 尤其是组织特异性的线粒体疾病。

关键词: 线粒体遗传疾病; 永生淋巴细胞系; 转线粒体细胞系; 转化; 融合

Cellular models for mitochondrial DNA-based diseases: lymphoblastoid cell lines and transmitochondrial cybrids

Jiji Sun, Xiaoxu Zhao, Lihua Qiao, Shuang Mei, Zhipeng Nie, Qinghai Zhang, Yanchun Ji, Pingping Jiang, Min-Xin Guan

Institute of Genetics, Zhejiang University and Department of Genetics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations cause a variety of mitochondrial DNA-based diseases which have been studied using Lymphoblastoid cell lines (LCLs) and transmitochondrial cybrids. Individual genetic information is preserved permanently in LCLs while the development of transmitochondrial cybrids provide *ex-vivo* cellular platform to study molecular mechanism of mitochondrial DNA-based diseases. The cytoplasmic donor cells for previous transmitochondrial cybrids come from patient's tissue or platelet directly. Here, we depicted in details the principle, methods and techniques to establish LCLs from frozen peripheral bloods harboring mitochondrial 4401G>A mutation by infection of Epstein Barr virus, and then to generate cybrids using ρ^0 206 and LCLs. The process of establishing these two cellular mod-

收稿日期: 2016-03-11; 修回日期: 2016-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31371270)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31371270)]

作者简介: 孙吉吉, 硕士, 实验师, 研究方向: 分子与细胞生物学。E-mail: jijisun@zju.edu.cn

通讯作者: 蒋萍萍, 博士, 副教授, 研究方向: 人类遗传学。E-mail: ppjiang@zju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-085

网络出版时间: 2016/6/6 16:16:33

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160606.1616.006.html>

els was summarized into four steps as follows: (1) Generation of LCLs; (2) Transformation; (3) Selection; (4) Verification. To faithfully represent the function of mtDNA mutation, we analyzed and identified the sites of mtDNA mutations and copy numbers of each cellular models as well as the karyotype of transmitochondrial cybrids. Those clones with consistent parameters were selected for preservation and future analysis of the function of point mutations of mtDNA. Although these two cellular models play important roles in understanding molecular mechanism of mitochondrial DNA-based diseases on the cellular level, their limitations should be considered when elucidating the character of tissue specificity of mitochondrial DNA-based diseases.

Keywords: mitochondria disease; lymphoblastoid; transmitochondrial cybrids; transformation; fusion

线粒体是半自主性细胞器, 其功能受细胞核基因组和线粒体基因组(mtDNA)两套遗传系统的协同作用^[1]。线粒体 DNA 突变导致的线粒体功能障碍与多种疾病相关, 如线粒体眼病、线粒体脑肌病、线粒体心肌肥厚症、药物性耳聋等(<http://www.mitomap.org/MITOMAP>)。早期线粒体遗传疾病的研究因很难获得携带线粒体突变的细胞系而受到限制, 而永生淋巴细胞系(Lymphoblastoid cell lines, LCLs)和转线粒体细胞系(Transmitochondrial cybrids)技术的发展不仅为线粒体遗传疾病研究提供了稳定的患者源遗传资源库, 也为线粒体遗传疾病的分子机制研究建立了理想的细胞模型^[2-4]。

在早期研究报道中, 转线粒体细胞系的胞质供体主要来自于患者外周血的血小板或者患者肌肉组织的成纤维细胞^[5,6]。为使研究者在体外也能持续稳定的得到胞质供体, 永生淋巴细胞系技术得到了广泛地应用。永生淋巴细胞系可从全血中分离的淋巴细胞进行构建, 也可直接用全血构建。本文的实验方法则证明用冻存全血构建永生淋巴细胞系的操作既方便, 成功率又高。构建的永生淋巴细胞可用于线粒体遗传疾病的研究, 但并不能排除个体之间核遗传背景的影响。由此提出了均一核遗传背景的转线粒体细胞系的构建。尤其是在 20 世纪 80 年代末, King 和 Attardi 等^[2]建立的 ρ^0 206 细胞系极大促进了线粒体遗传疾病的研究^[7-9], 并成为目前应用最广的核遗传背景供体。由于 ρ^0 206 是骨肉瘤细胞系 143B·TK⁻ 细胞的衍生物, 在扩增与筛选中不能排除肿瘤细胞的非整数倍体(Aneuploid)倾向^[10], 从而有可能出现核遗传背景不均一的假阳性克隆株。因此鉴于肿瘤细胞的非整数倍现象和线粒体拷贝数(或线粒体含量)对线粒体功能的影响^[11], 本文在筛选与鉴定永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系时不仅进行了突变位

点的鉴定, 还检测了线粒体拷贝数; 同时对转线粒体细胞进行核型分析, 选取各参数一致的细胞系进行了后续的功能分析。

永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系的构建可分别独立进行。本文以源于原发性高血压患者的 m.4401 A>G 突变^[12]为例, 梳理两种人源细胞模型构建的方法, 将技术简单归纳为 4 个步骤: (1)构建永生淋巴细胞系; (2)转化; (3)筛选; (4)鉴定。并从这 4 个方面进行技术和原理的详细介绍, 以促进线粒体遗传资源的永久保存与合理应用(图 1)。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用 3 种细胞系分别为: (1)B95-8 细胞株, 源自 EBV 化的绒猴白细胞, 可连续释放高滴度的转染病毒 EBV; (2)143B·TK⁻ 培养于 5% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, 加入 1 mmol/L 丙酮酸; (3) ρ^0 206 细胞是骨肉瘤细胞系 143B·TK⁻ 细胞的衍生物, 培养于 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, 加入 50 μ g/mL 尿嘧啶(Urdine)。实验所需的外周血来自正常志愿者和病人, 均已签知情同意书。本研究以携带线粒体 DNA 4401A>G 突变的患者外周血为例, 进行技术与方法的说明, 并根据需要, 以正常对照或 143B·TK⁻ 或 ρ^0 206 进行阴性对照分析。

实验所需的主要试剂如下: 磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS); 胎牛血清(Fetal calf serum, FBS), 透析型胎牛血清(Dialyzed FBS); DMEM 高糖培养基; 不含钙离子(Ca^{2+})的 DMEM、基础培养基(Eagles's minimum essential medium, MEM)和 RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific 公司, 上海); 尿嘧啶(Urdine)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、

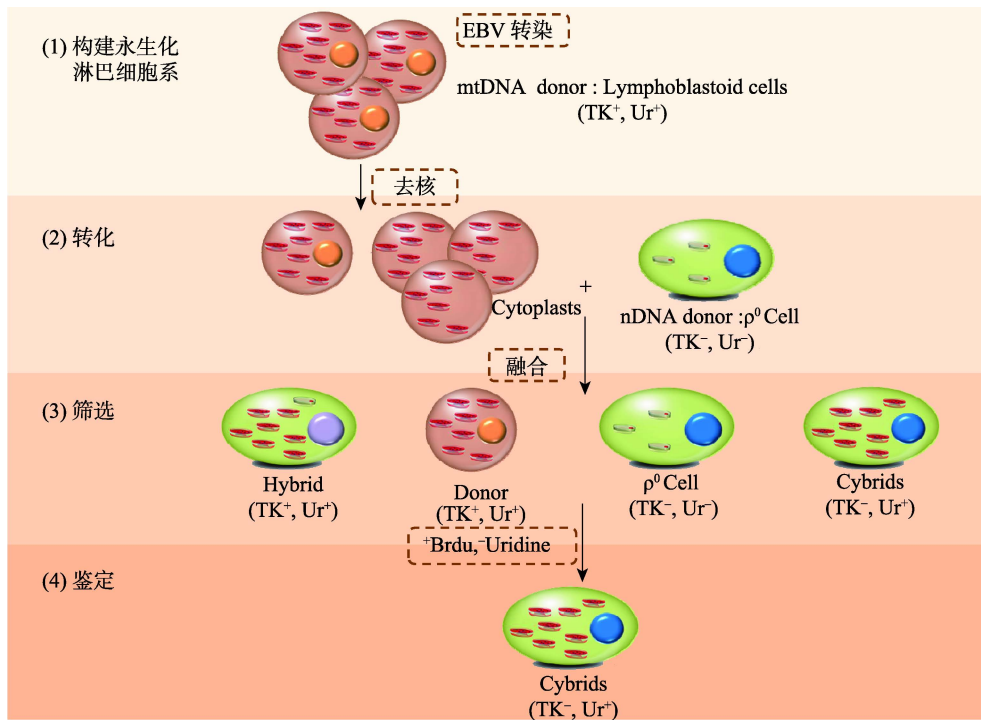


图 1 永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系的构建

Fig. 1 Establishment of lymphoblastoid cell lines and transmitochondrial cybrids

细胞松弛素 B、聚蔗糖(Ficoll)、寡霉素(Oligomycin)、FCCP(Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine)、抗霉素 A(Antimycin A)和鱼藤酮(Rotenone)(Sigma 公司, 上海)、聚乙二醇(PEG)(Roche 公司, 上海)。

转化培养基: 20%的 FBS 的 RPMI-1640 培养基, 其中青链霉素终浓度为 100 U/mL, 1 mmol/L 丙酮酸, 10 μ g/mL 植物凝集素(PHA); 缓和培养基: 10% FBS 的 DMEM(含丙酮酸), 加 BrdU 和 Uridine 至终浓度为 50 μ g/mL; 筛选培养基: 10% 透析胎牛血清的 DMEM(不含丙酮酸), 加 BrdU 至终浓度为 50 μ g/mL; 常规培养基: 10% FBS 的 DMEM(含丙酮酸), 加 BrdU 至终浓度为 50 μ g/mL。聚蔗糖母液: 聚蔗糖粉末以 1:1 的质量比溶于无菌双蒸水后灭菌, 4°C 过夜搅拌后备用; 离心液: 50%的聚蔗糖 1.25 mL, 3.7 mL MEM, 细胞松弛素 B 的终浓度为 100 μ g/mL; 胞质液: 20% FBS 的 DMEM(不含 Ca^{2+}), Uridine 终浓度为 25 μ g/mL。

1.2 冻存全血法构建永生淋巴细胞系

以通用的 Epstein Barr virus(EBV)病毒感染得到永生淋巴细胞系。

准备新鲜 EBV 病毒液: 扩大培养 B95-8 细胞系至培养液体积达到 30 mL。当细胞密度达到 1×10^6 个/mL 时, 饥饿处理 7 d, 收集细胞悬液(1000 r/min)。此时上清中已富集有大量病毒 EBV。为保证病毒活性, 上清液冻存于 4°C; 沉淀置于 -80°C 反复冻融 3 次, 最大限度的释放细胞中残留的 EBV 病毒。最后将上清液与沉淀混合, 摇匀, 过滤, 1 mL 分装, -80°C 保存。建议不要反复冻融已制备好的病毒液(初次实验需验证 EBV 病毒滴度, 以方便后续实验用量)。

冻存血一般是采集的全血加 10% DMSO, 分装于冻存管并保存于 -80°C 冰箱。建系时, 先取出 0.5 mL 复苏, 加入 10 mL RPMI 1640, 混匀后 1200 r/min 离心 5 min; 弃上清, 再以 1:2 体积比加入新鲜病毒液并充分混匀, 再转移至 1 mL 转化培养基中, 置于 25 cm^2 培养瓶静止培养一周, 不必换液。一周后, 细胞将出现聚团, 然后将细胞团移至正常的淋巴细胞培养基中扩大培养、鉴定并冻存。

1.3 转化

转化即将构建的永生淋巴细胞系通过聚蔗糖梯度离心去核, 形成胞质供体; 再与核供体 ρ^0 206 细

胞进行融合。

1.3.1 胞质供体细胞的去核化

准备源于患者和正常对照的永生淋巴细胞(6×10^6), 先用 PBS 清洗一遍, 再用 5 mL 离心液均匀悬浮细胞, 置于细胞培养箱备用。根据表 1 的配制比例, 分别配制 25%、17%、16%、15% 和 12.5% 的去核聚蔗糖梯度母液。按浓度高到低的顺序, 分别取各梯度液 2 mL、2 mL、0.5 mL、0.5 mL 和 2 mL 并依次加入至硝酸纤维素管中。室温静置约 30 min 使各梯度分界面清晰。然后将备用的永生淋巴细胞缓慢加入, 最后用超速离心机恒温 37°C 、真空、25000 r/min 离心 1 h。

离心后的离心管中可见明显的两层梯度界面。细胞核位于 25% 与 17% 的聚蔗糖界面; 胞质体位于 15% 与 17% 之间的聚蔗糖界面。去除部分上清后, 用 2 mL 的注射器于硝酸纤维素管侧面垂直插入胞质体层, 抽取 1 mL 胞质体。用不含 Ca^{2+} 的 DMEM 将抽取的胞质供体稀释 10 倍后混匀离心, 以去除胞质中残留的聚蔗糖。再用 5 mL 胞质液清洗, 以彻底去除残留的聚蔗糖。最后用 2 mL 胞质液重悬, 放置 37°C 培养箱, 孵育 30 min, 使胞质体恢复成球形。期间可取混悬液于显微镜下观察并计算去核的效率。

1.3.2 融合细胞

在胞质体恢复的过程中, 准备 ρ^0 206 细胞。一般胞质供体与核供体的比例为 6:1, 即准备 1×10^6 ρ^0 206 细胞, 与胞质供体液轻柔混合; 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 用不含 Ca^{2+} DMEM 洗沉淀, 再次离心, 弃上清; 再加入 1 mL PEG, 轻柔混合 1 min; 用不含 Ca^{2+} 的 DMEM 培养液稀释 10 倍, 离心, 去除溶液中残留的 PEG; 最后用缓和培养基重悬细胞,

细胞以 1000 个/孔、2000 个/孔、4000 个/孔接种入 96 孔板, 3×10^4 个/孔接种入 6 孔板。

1.4 克隆筛选

2~3 d 后可根据融合细胞状态更换至筛选培养基, 每 3 d 换一次培养液。一般经 10~14 d 筛选后, 形成单克隆。筛选培养基内含有 Brdu, 可有效杀死淋巴细胞, 同时筛选培养基内不含有尿嘧啶和丙酮酸, 不适于 ρ^0 206 的生长, 最后存活下来的细胞克隆即转线粒体细胞株, 但不排除有假阳性克隆。一般挑取 10~15 个单克隆细胞株用常规培养基进行扩增培养, 用于后续的鉴定分析。

1.5 细胞系鉴定

1.5.1 线粒体突变位点鉴定

适时提取扩增培养的永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系的全基因组 DNA, 针对线粒体 4401 位点的进行引物扩增^[12], 并用 Sanger 直接测序法或酶切法进行鉴定分析, 主要排除假阳性克隆及含有异质性 m.4401A>G 的细胞系(即杂合突变)。

1.5.2 线粒体拷贝数测定

对已鉴定线粒体位点的克隆株细胞(正常对照和 4401 突变)进行线粒体拷贝数检测。本实验以 18S rRNA 为核基因内参, 以 MT-ND1 区段序列代表线粒体 DNA, 通过实时荧光 PCR(Real-time PCR)测定相对的 mtDNA 和 18S rRNA 比值^[13]。线粒体拷贝数没有显著差异的细胞用于后续实验。

1.5.3 转线粒体细胞系的核型鉴定

因核供体 ρ^0 206 源于肿瘤细胞, 为排除非整数倍体对细胞功能的影响, 转线粒体细胞系的选取除了进行线粒体突变位点和拷贝数的分析, 还需进行核型分析, 以确定对照组与患者组的转线粒体细胞均有一致的核遗传背景, 且与原核供体 ρ^0 206 的遗传背景一致。本文采用了 4 个常用于核型分析的短串联重复序列(Short-tandem repeats, STRs)D13S317、D16S539、D7S820 和 D5S818 进行了核型鉴定与分析(Sangon Biotech, 上海)。

1.6 线粒体呼吸链功能检测

为检测选取的携带 m.4401A>G 突变的转线粒

表 1 聚蔗糖梯度液配制

Table 1 The ficoll gradients

聚蔗糖终浓度(%)	50%聚蔗糖(mL)	MEM 溶液(mL)	去离子水(mL)	细胞松弛素 B (mL)
25	25	12.5	12.25	0.25
17	17	12.5	20.25	0.25
16	16	12.5	21.25	0.25
15	15	12.5	22.25	0.25
12.5	12.5	12.5	24.75	0.25

体细胞系是否存在线粒体呼吸链功能缺陷, 选用了 143B·TK⁻ 细胞、线粒体拷贝数和核型均一致的正常对照与携带 m.4401A>G 突变的转线粒体细胞各一株, 进行细胞氧耗速率(Oxygen consumption rate, OCR)检测^[13], 初步检验 m.4401A>G 突变对线粒体功能的影响。

2 结果与分析

2.1 线粒体突变位点鉴定

为了证明细胞中突变位点的存在, 且与患者携带的突变一致, 是纯合突变, 同时也为了排除 ρ^0 206 细胞中线粒体 DNA 的影响, 本文对构建的两种细胞模型都进行线粒体位点的鉴定。图 2 显示, 来自阳性对照的 C1 永生淋巴细胞在 4401 位点是 A 碱基; 患者来源的永生淋巴细胞系中该位点已突变为纯合的 G 碱基, 表明细胞携带有纯合的 m.4401A>G 突变, 与患者体内细胞一致。选取的两个转线粒体细胞系 T1(4401T1)和 T5(4401T5)也含有纯合的 m.4401A>G 突变。这些细胞可用于贮存或后续分析。

2.2 线粒体拷贝数分析

不同个体来源和不同组织来源的细胞所含的线粒体含量不同。细胞线粒体含量和 mtDNA 拷贝数影

响其线粒体呼吸链功能^[11]。通常细胞的线粒体含量用 mtDNA 拷贝数来替代分析。因此用人源细胞研究线粒体突变对线粒体功能的影响时, 需选取 mtDNA 拷贝数相一致的细胞系, 才能进行有效的比较分析。本文以 143B·TK⁻ 细胞为内参, 选取转线粒体系 Cybrids-C1、Cybrids-C2、Cybrids-C3 正常组为对照, 与 4401T1、4401T2、4401T5 和 4401T7 突变细胞系进行分析, 结果发现其中 4401T7 的拷贝数与 143B·TK⁻ 及对照组的数值存在显著差异($P<0.01$), 仅为正常细胞的 65%, 不能选用; 而 4401T1/T2/T5 可用于后续分析(图 3)。

2.3 转线粒体细胞系的核型分析

为保证融合细胞株均来源与同一组 ρ^0 206, 以及各克隆株遗传背景的均一性, 本文以 ρ^0 206 细胞为参照, 每组至少选取已经过线粒体突变位点和拷贝数筛选的 5~7 个克隆株细胞进行核型分析。结果显示 Cybrids-C1 和 4401T5 两细胞系与 ρ^0 206 峰图一致(图 4), 表明两细胞系的核遗传背景均来自同一 ρ^0 206 细胞。但 4401T13 的核型存在异质性, 不建议选用。经核型鉴定的 Cybrids-C1 和 4401T5 可用于后续的线粒体功能分析。

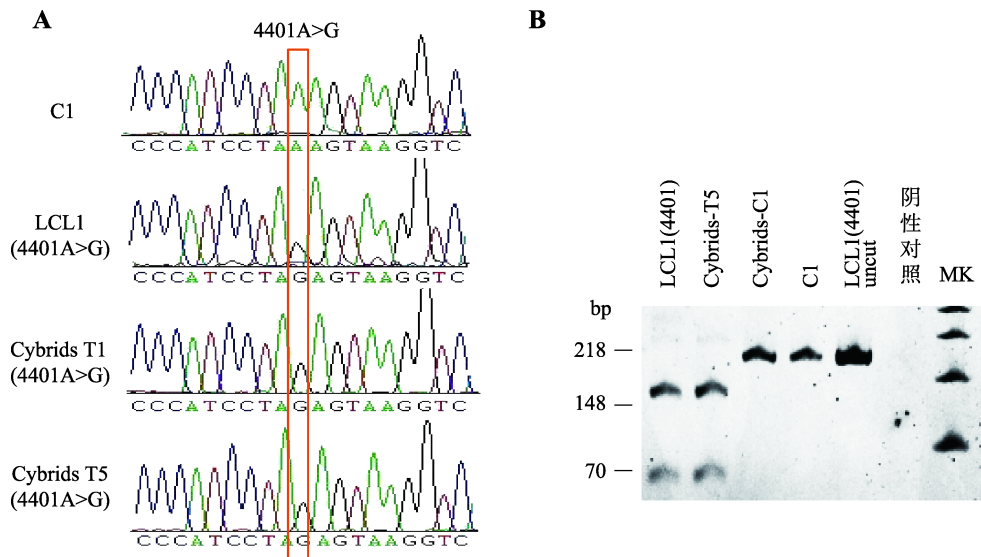


图 2 永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系中 m.4401A>G 位点鉴定

Fig. 2 Identification of m.4401A>G in LCLs and cybrids

A: Sanger 测序结果。由上到下依次为正常对照的永生淋巴细胞系 C1、携带有 4401A>G 突变的永生淋巴细胞系, 患者源的转线粒体细胞系 T1 和 T5 的位点测序图。方框内指示 4401A>G 位点。B: 限制性内切酶的酶切结果。4401A>G 突变产生了酶切位点, PCR 产物经酶切后, 携带有 4401A>G 突变的被酶切成两个片段(148 bp 和 70 bp)。

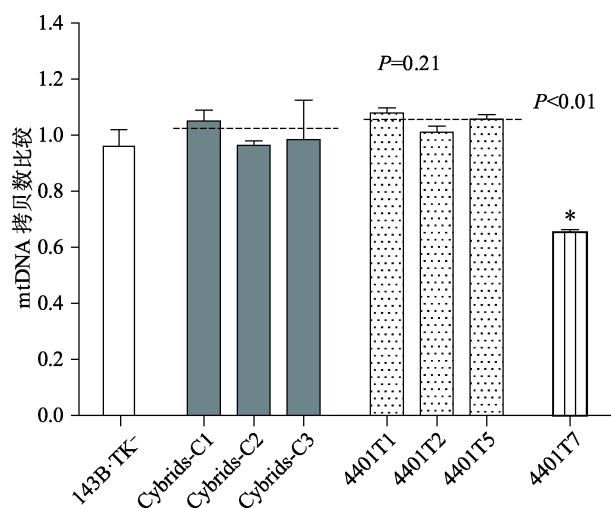


图3 转线粒体细胞系 mtDNA 拷贝数分析

Fig. 3 The relative level of mtDNA copy number in cybrids

143B·TK⁻为内参; Cybrids-C1、Cybrids-C2、Cybrids-C3 为阳性对照组; 4401T1、T2、T5 和 T7 为实验组。4401T7 与对照组间存在显著差异, *表示 $P<0.01$; 4401T1、T2 和 T5 与对照组之间没有差异, $P=0.21$ 。

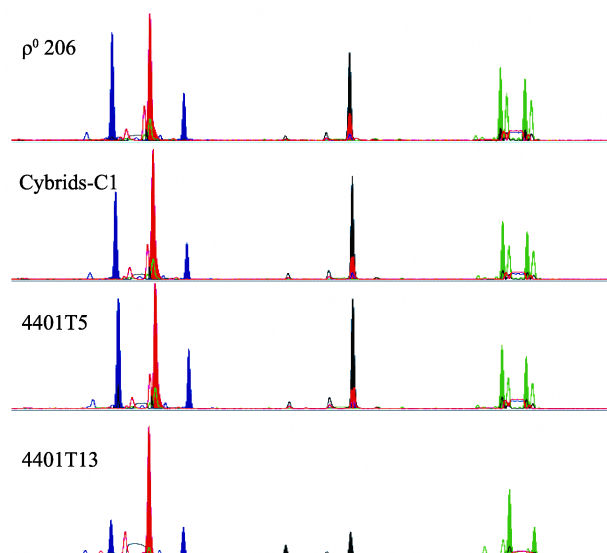


图4 转线粒体细胞系的核型分析

Fig. 4 Genotype analysis of clones with four alleles

核供体 ρ^0 206 细胞, 正常对照(Cybrids-C1)和携带 m.4401A>G 的转线粒体细胞(4401T5、T13)同时进行核型分析(红色代表 D5S818; 绿色代表 D7S820; 蓝色代表 D13S317 和黑色代表 D16S539)。

2.4 转线粒体细胞系的线粒体呼吸链功能分析

经过各参数筛选与鉴定的转线粒体细胞可用于 mtDNA 突变导致的线粒体功能障碍研究。m.4401A>G

突变位于线粒体重链基因 $tRNA^{Met}$ 和轻链基因 $tRNA^{Gln}$ 的连接处。突变有可能通过影响线粒体前体 mRNA 的剪切而干扰 $tRNA^{Met}$ 和 $tRNA^{Gln}$ 的转录水平, 从而影响线粒体蛋白合成, 并最终导致线粒体呼吸功能缺陷。本课题组之前在一个母系遗传高血压汉族家系中发现 m.4401A>G 突变, 用患者源永生淋巴细胞分析显示线粒体呼吸链功能缺陷^[12]。为真实反映 m.4401A>G 的功能, 本文对鉴定得到的 Cybrids-C1 和 4401T5 进行了线粒体氧耗速率(OCR)预实验, 其中 143B·TK⁻为内参, Cybrids-C1 为阳性对照, 以验证 m.4401A>G 对线粒体功能的影响。OCR 曲线变化反应了细胞系线粒体呼吸链功能的变化^[17]。

图5显示 143B·TK⁻和正常对照的 OCR 曲线一致, 表明阳性对照和 143B·TK⁻细胞的线粒体呼吸链功能未发生明显变化。但 4401T5 的 OCR 值, 在加了 Oligomycin 和 FCCP 后的变化非常明显, 表明与线粒体 ATP 产能相关的氧耗率下降异常明显^[13], 验证了 m.4401A>G 突变对线粒体呼吸链功能的影响。

3 讨论

人源永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系是线粒体遗传疾病研究的重要工具。人全血中静止期的 B 淋巴细胞可通过 EBV 病毒感染获得有持续增殖能力

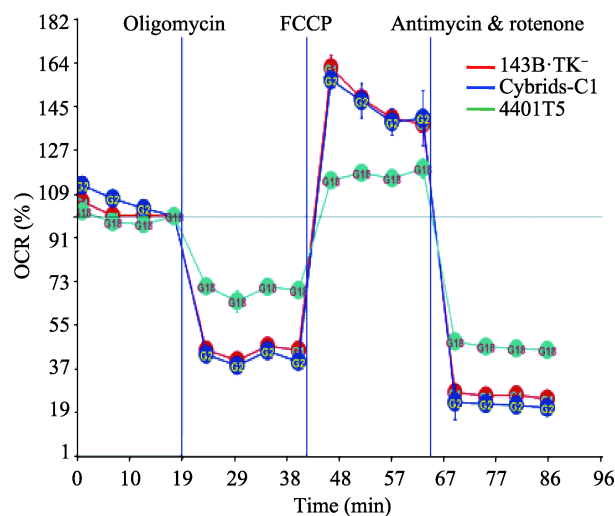


图5 转线粒体细胞系中线粒体呼吸链的氧耗分析

Fig. 5 Mitochondrial oxygen consumption assay in cybrids

143B·TK⁻ (红色), 正常对照(Cybrids-C1, 蓝色)和携带 m.4401A>G 的转线粒体细胞(4401T5, 浅绿色)经不同抑制剂处理后的线粒体氧耗曲线。

的永生淋巴细胞系^[14],使患者细胞水平的生物学特征得以永久保存,同时为遗传疾病的研究提供了持续的宝贵材料。

本文采取冻存全血法构建永生淋巴细胞系,较常用的环孢霉素 A 法用量少,操作简单、时间短。环孢霉素 A 法需新鲜的血液样本,对血样运输与存贮的温度和时间都有较高要求。环孢霉素 A 法需先从全血中分离淋巴细胞,因此血样用量也较大(一般 3~4 mL 全血)。冻存全血建系对血液运输与存贮时间没有要求,建系用量仅需全血 0.5 mL,血样用量大大减少。同时血样冻存后,T 淋巴细胞的活性降低,B 淋巴细胞转化效率比新鲜血建系高,因此转化培养基中也无需再加入环孢霉素 A。而且血样经分装冻存,可以分批次建系,降低了实验强度,也保障了实验成果。

永生化淋巴细胞系,经细胞松弛素 B 处理后,通过超高速离心即可将细胞质和细胞核有效分离。通过分离富集得到的胞质体较纯净,为后续的融合效率提供了保障。核供体 ρ^0 206 细胞是来自通过 EB 长期处理后的 143B-TK⁻。EB 插入裸露的线粒体 DNA 双链之间,抑制线粒体 DNA 的复制,经细胞不断分裂而稀释线粒体 DNA,从而得到线粒体 DNA 拷贝数极低的 ρ^0 206 细胞系。有相关报道提及 EB 也有可能致 ρ^0 206 细胞核多倍体化,进而影响线粒体功能紊乱的表征。同时 ρ^0 206 细胞是肿瘤细胞,有非整数倍体倾向,因此对以 ρ^0 206 为核遗传背景来源的转线粒体细胞需进行核型分析,以确保线粒体功能障碍真实源自于线粒体 DNA 的突变。近期研究文献报道用罗丹明 6G(R6G)处理核供体细胞以获得类 ρ^0 细胞系^[15]。为反映一些线粒体遗传疾病的组织特异性,研究者们也设法用不同组织来源的细胞构建类 ρ^0 细胞,如 SH-SY5Y、NT2 甚至小鼠的胚胎干细胞都成为了核供体^[16~18]。

如图 1 所示,当胞质供体与 ρ^0 206 细胞融合理论上可产生 4 种细胞,分别是淋巴细胞核与 ρ^0 206 细胞核融合的杂种细胞(Hybrids)、永生化淋巴细胞、未融合的 ρ^0 206 细胞和转线粒体细胞。实际观察发现,杂种细胞和永生化淋巴细胞出现概率极低。因为超高速梯度离心已富集了纯净的胞质,大大降低了杂种细胞和永生化淋巴细胞的概率;同时,筛选

培养基中的 Brdu,可去除外源的胸苷激酶阳性细胞,最后筛选得到的即为转线粒体细胞系。但不排除有部分 ρ^0 206 细胞经传代扩增,细胞内线粒体含量上调而丧失了对尿嘧啶和丙酮酸的依赖性,因此需对克隆株进行突变位点的验证。如果出现杂合突变,不排除 ρ^0 206 细胞线粒体 DNA 的干扰。但这种情况在实际实验操作中,很少出现。

当然永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系在研究遗传疾病的分子机制中有一定的局限性,但转线粒体细胞构建的胞质置换和细胞融合的思路或方案在线粒体遗传疾病的干预和治疗策略中有广泛的应用前景^[19,20]。随着人诱导多能干细胞(iPSCs/hiPSCs)的发展,患者源 iPSCs/hiPSCs 又为遗传疾病的研究提供了新的细胞模型^[21,22]。但 iPSCs 对技术和方法有较高要求,在推广应用中永生淋巴细胞系和转线粒体细胞比较成熟。如何提高患者源 iPSCs 的成功率和可推广性,是未来研究的方向。

参考文献(References):

- [1] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457-465. [DOI]
- [2] King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA-repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 1989, 246(4929): 500-503. [DOI]
- [3] Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid cell lines: a continuous in vitro source of cells to study carcinogen sensitivity and DNA repair. *Int J Mol Cell Med Spring*, 2012, 1(2): 75-87. [DOI]
- [4] Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathies. *Redox Biology*, 2014, 2: 619-631. [DOI]
- [5] Meng HD, Qi Y, Pan H, Jiang YW, Wu XR. Establishment of platelet-mediated transmitochondrial cell model. *China J Med Genet*, 2001, 18(2): 132-134.
孟洪弟, 戚豫, 潘虹, 姜玉武, 吴希如. 血小板介导的转线粒体细胞模型的制备. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18(2): 132-134. [DOI]
- [6] Chomyn A, Meola G, Martinuzzi A, Daga A, Yoneda M, Attardi G. Cellular-models of mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet*, 1991, 49: 7. [DOI]
- [7] Ghosh SS, Swerdlow RH, Miller SW, Sheeman B, Parker WD, Davis RE. Use of cytoplasmic hybrid cell lines for

- elucidating the role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 893: 176–191. [DOI]
- [8] Gong SS, Peng YY, Jiang PP, Wang M, Fan MJ, Wang XJ, Zhou H, Li HW, Yan QF, Huang TS, Guan MX. A deafness-associated tRNA^{His} mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 8039–8048. [DOI]
- [9] Arduíno DM, Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM. A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. In: Weissig V, Edeas M, eds. *Mitochondrial Medicine: Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2015, 1265: 415–424. [DOI]
- [10] Pye D, Kyriakouli DS, Taylor GA, Johnson R, Elstner M, Meunier B, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Taylor RW, Turnbull DM, Lightowlers RN. Production of trans-mitochondrial cybrids containing naturally occurring pathogenic mtDNA variants. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(13): e95. [DOI]
- [11] Bianco A, Martínez-Romero I, Bisceglia L, D'Agruma L, Favia P, Ruiz-Pesini E, Guerriero S, Montoya J, Petruzzella V. Mitochondrial DNA copy number differentiates the Leber's hereditary optic neuropathy affected individuals from the unaffected mutation carriers. *Brain*, 2015, 139(Pt 1): e1. [DOI]
- [12] Li RH, Liu YQ, Li ZB, Yang L, Wang SW, Guan MX. Failures in mitochondrial tRNA^{Met} and tRNA^{Gln} metabolism caused by the novel 4401A>G mutation are involved in essential hypertension in a Han Chinese family. *Hypertension*, 2009, 54(2): 329–337. [DOI]
- [13] Yu JL, Zheng J, Zhao XX, Liu JX, Mao ZC, Ling YN, Chen DN, Chen C, Hui LL, Cui LM, Chen Y, Jiang PP, Guan MX. Aminoglycoside stress together with the 12S rRNA 1494C>T mutation leads to mitophagy. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114650. [DOI]
- [14] Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WER. EBV immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiol*, 2008, 37(Suppl 1): i41–i45. [DOI]
- [15] Williams AJ, Murrell M, Brammah S, Minchenko J, Christodoulou J. A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and rhodamine 6G. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(9): 1691–1697. [DOI]
- [16] Miller SW, Trimmer PA, Parker WD, Davis RE. Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties. *J Neurochem*, 1996, 67(5): 1897–1907. [DOI]
- [17] Binder DR, Dunn WH, Swerdlow RH. Molecular characterization of mtDNA depleted and repleted NT2 cell lines. *Mitochondrion*, 2005, 5(4): 255–265. [DOI]
- [18] Kirby DM, Rennie KJ, Smulders-Srinivasan TK, Acin-Perez R, Whittington M, Enriquez JA, Trevelyan AJ, Turnbull DM, Lightowlers RN. Trans-mitochondrial embryonic stem cells containing pathogenic mtDNA mutations are compromised in neuronal differentiation. *Cell Proliferat*, 2009, 42(4): 413–424. [DOI]
- [19] Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, Murdoch AP, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN, Herbert M, Turnbull DM. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2010, 465(7294): 82–85. [DOI]
- [20] Couzin-Frankel J. Eggs' power plants energize new IVF debate. *Science*, 2015, 348(6230): 14–15. [DOI]
- [21] Ma H, Folmes CDL, Wu J, Morey R, Mora-Castilla S, Ocampo A, Ma L, Poulton J, Wang XJ, Ahmed R, Kang E, Lee Y, Hayama T, Li Y, Van Dyken C, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Koski A, Mitalipov N, Amato P, Wolf DP, Huang TS, Terzic A, Laurent LC, Izpisua Belmonte JC, Mitalipov S. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature*, 2015, 524(7564): 234–238. [DOI]
- [22] Chen JR, Tang ZH, Zheng J, Shi HS, Ding J, Qian XD, Zhang C, Chen JL, Wang CC, Li L, Chen JZ, Yin SK, Shao JZ, Huang TS, Chen P, Guan MX, Wang JF. Effects of genetic correction on the differentiation of hair cell-like cells from iPSCs with MYO15A mutation. *Cell Death Differ*, 2016, doi: 10.1038/cdd.2016.16. [DOI]

(责任编辑: 刘峰)