

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.001

· 基础研究 ·

HepG2 细胞中线粒体形状的动态变化

高关刚[#] 盛园园[#] 张嘉杰 刘佳明 徐 俐[△]

(清华大学生命科学院 北京 100084)

摘要 目的:研究 HepG2 细胞中线粒体形状动态变化过程中的功能变化及其初步分子机制。**方法:**HepG2 细胞经过 HBSS 缓冲液饥饿处理后,使用线粒体氧化磷酸化解偶联剂 CCCP、脂肪酸受体 GPR40/120 激动剂 GW9508、脂肪酸油酸 OA 和钙离子载体 Ionomycin 等 4 种不同药物处理,通过共聚焦显微镜观察和流式细胞分析的手段检测细胞中线粒体形状和功能发生的改变。然后,通过基因沉默 Drp1, Mff 或者 Fis1 蛋白,初步研究调控线粒体形状改变的分子机制。**结果:**经过 CCCP 和 GW9508 处理细胞中产生甜甜圈线粒体,而 OA 和 Ionomycin 处理产生球状线粒体。CCCP, OA 和 Ionomycin 使线粒体去极化,CCCP、GW9508、OA 或者 Ionomycin 单独处理在一定程度上影响细胞中活性氧簇 ROS。甜甜圈线粒体产生由 Drp1 介导,而球状线粒体形成依赖于 Drp1 和 Mff。**结论:**线粒体的形态与其功能相互联系,Drp1 和 Mff 蛋白对于细胞线粒体形状动态改变过程中形状的调整和适应具有很重要的作用。

关键词:甜甜圈线粒体;球状线粒体;线粒体动力蛋白相关蛋白 1;线粒体分裂因子;动态变化

中图分类号:Q2-33;Q244 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-201-08

Dynamic Change of Mitochondria Morphology in HepG2 Cells

GAO Guan-gang[#], SHENG Yuan-yuan[#], ZHANG Jia-jie, LIU Jia-ming, XU Li[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the functional alteration and preliminary molecular mechanism of mitochondria morphology dynamic change in HepG2 cells. **Method (s):** After starved by HBSS buffer, HepG2 cells were treated with 4 kinds of different drugs including mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler CCCP, fatty acid receptor GPR40/GPR120 agonist GW9508, oleic acid OA and calcium ionophore Ionomycin, then mitochondria morphology and function were observed and measured by confocal microscope observation and flow cytometry analysis. The molecular mechanism of mitochondria morphology dynamic change was preliminarily studied by knock-down of dynamin-related protein 1 (Drp1), mitochondrial fission factor (Mff) or fission mitochondrial 1 (Fis1). **Result(s):** Cells had Donut mitochondria with mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler CCCP or fatty acid receptor GPR40/120 agonist GW9508 treatment while Ball mitochondria happened with OA or Ionomycin treatment. CCCP, OA and Ionomycin depolarized mitochondria, and CCCP, GW9508, OA or Ionomycin alone affected the reactive oxygen species (ROS) in cells to some extent. Donut mitochondria formation was mediated by Drp1, whereas Ball mitochondria formation was dependent on Drp1 and Mff. **Conclusion (s):** The morphology of mitochondria is related to its function, Drp1 and Mff play an important role in mitochondria morphology adjustment.

Key words: Donut mitochondria; Ball mitochondria; Drp1; Mff; Dynamic change

Chinese Library Classification(CLC): Q2-33; Q244 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-201-08

前言

线粒体(Mitochondria)是不同细胞和组织广泛需求的细胞器,其主要功能包括:参与脂肪酸氧化、通过三羧酸循环调节能量代谢和物质代谢、通过氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation, OXPHOS)产生三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、调

节程序性细胞死亡、细胞内钙离子稳态调控以及产生和调节活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)^[1-3]。线粒体的缺陷导致多种复杂的疾病^[4],例如线粒体呼吸链复合物 I 的缺陷可导致成人视神经萎缩或者婴儿中引起急性坏死性脑病^[5,6]。编码线粒体 DNA 聚合酶 γ 的缺陷导致肝脑疾病,青少年灾难性癫痫或成人发作性共济失调 - 神经病综合征^[7]。线粒体质量和功能活

[#] 为共同第一作者

作者简介:高关刚,男,博士研究生,主要研究方向:生物学, E-mail: ggg12@mails.tsinghua.edu.cn;

盛园园,女,硕士研究生,主要研究方向:生物学, E-mails: chengyyl2@mails.tsinghua.edu.cn

[△] 通讯作者:徐俐,女,博士,副研究员,硕士生导师,主要研究方向:生物学, E-mail: xulilulu@tsinghua.edu.cn, 电话:010-62797133

(收稿日期:2019-07-28 接受日期:2019-08-23)

性的下降与衰老相联系,并和衰老相关的疾病存在关联^[8]。首先,线粒体功能受损会引起干细胞功能下调,线粒体代谢物也会对干细胞的转录和表观遗传状态产生影响。另外,最近的研究发现,细胞内 α -酮戊二酸和琥珀酸的比例是维持小鼠胚胎肝细胞多能性的关键^[9]。其次,线粒体对于细胞衰老、慢性炎症均有影响。另外,信号通路调控的线粒体未折叠蛋白反应和线粒体自噬也能够调节寿命^[10]。

线粒体形状是动态变化的,能够通过融合(Fusion)和分裂(Fission)的过程在细长的互连线粒体网络和片段化的断开排列之间转换。线粒体主要通过以下蛋白和机制完成形态的转变:Mitofusins(Mfn1和Mfn2)和MitoPLD等蛋白介导线粒体外膜融合^[11-13],而L-OPA1参与线粒体内膜融合^[11,14,15];线粒体动力蛋白相关蛋白1(Dynamin-related protein 1, Drp1)及其受体线粒体分裂蛋白1(Fission mitochondrial 1, Fis1)、线粒体分裂因子(Mitochondrial fission factor, Mff)等蛋白介导线粒体外膜分裂^[16,17],而S-OPA1和MTP18参与线粒体内膜分裂^[2,15]。除了融合与分裂过程,细胞在某些情况例如使用线粒体解偶联剂可以产生类似甜甜圈的环状中空线粒体,称为甜甜圈线粒体(Donut mitochondria)^[18,19]。目前,越来越多的研究发现线粒体形态(Mitochondria morphology)与其功能密不可分^[1,11],许多证据表明线粒体动态的变化可能影响心血管功能,包括心脏发育、对缺血-再灌注损伤的反应、心力衰竭等^[20,21],如抑制线粒体分裂能够保护心脏抵抗缺血-再灌注的损伤^[22]。细胞在相应细胞和环境压力下,通过线粒体膜的融合与分裂改变形态从而适应代谢需求并且保证损伤细胞器的清除^[23]。线粒体形态与其相应功能包括膜电位和ROS的改变已有研究报道,过表达融合蛋白Mitofusion或者Opa1促进线粒体高度融合的同时能够抑制氧化压力导致的细胞凋亡^[22,24]。抑制分裂蛋白Fis1或Drp1也可以促进线粒体融合,同时帮助细胞抵抗外源诱导剂刺激下的线粒体去极化和细胞凋亡^[25]。细胞在高糖压力下,线粒体分裂是ROS增加的先决条件^[26],而过表达显性失活形式的Drp1可以有效阻止高糖压力下导致的线粒体分裂和随之而来的ROS增加^[26,27]。以上这些研究说明动态变化的线粒体形态和其功能之间存在联系,但是其中的机制目前仍不清楚^[28]。

本研究主要利用线粒体功能相关的氧化磷酸化解偶联剂(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP)、被广泛使用的脂肪酸-油酸(Oleic acid, OA)、脂肪酸受体GPR40/GPR120激动剂GW9508以及钙离子载体Ionomycin等四种药物处理(Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)饥饿处理之后的HepG2细胞,通过共聚焦显微镜观察细胞线粒体形态。此外,本研究还借助活性氧簇ROS染料DCFH-DA^[29]和线粒体膜电位染料JC-10^[30]等两种荧光染料,通过流式细胞分析的方式检测CCCP、GW9508、OA和Ionomycin等处理对线粒体ROS和膜电位的影响,以及通过siRNA敲低Drp1、Mff或Fis1的方式,研究线粒体形状动态变化对其功能的影响及其潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 人肝癌HepG2细胞系购于美国ATCC;胎牛

血清购自Biological Industries公司;DMEM细胞培养基,青霉素和链霉素(100 $\times$),HBSS缓冲液,活细胞培养皿购于Thermo Fisher Scientific公司;CCCP,油酸(Oleic Acid, OA)购于Sigma-Aldrich公司。活性氧簇ROS检测染料DCFH-DA和线粒体膜电位指示剂JC-10购于AAT Bioquest公司。离子霉素Ionomycin购于碧云天。GW9508购于Selleck公司。标记线粒体所使用的mito-dsRED和Tom20-GFP质粒均来自于清华大学俞立课题组。

1.1.2 试验仪器 细胞培养箱来自NuAire公司,实时荧光定量PCR仪(型号7500)来自Applied Biosystems公司,细胞电击转染仪(型号Amaza Nucleofector II)来自Lonza公司,透射电子显微镜(型号H-7650B)来自日立公司,流式细胞分析仪(型号Calibur)来自BD公司,扫描共聚焦显微镜(型号A1R+)来自尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和饥饿处理 HepG2细胞在含有10%血清的DMEM培养基(补充1 $\times$ 青霉素和链霉素)中进行培养,培养箱设置为37 $^{\circ}\text{C}$,5%的CO₂,80%的湿度。细胞前一天消化电转质粒后接种到活细胞培养皿中,第二天细胞用HBSS缓冲液清洗两遍,再加入适量HBSS缓冲液饥饿细胞2h。接着换成预先混好药物的HBSS后,使用尼康A1R+扫描共聚焦显微镜活细胞模块对线粒体进行实时观察。

1.2.2 细胞转染 HepG2细胞通过电转(Electroporation)的方式进行质粒和siRNA的转染。细胞经过消化、离心后,使用100 μL 电转缓冲液重悬细胞,转移放入1.5mL EP管中,将需要转染的质粒加入EP管用微量移液器和细胞混匀后再转移到电转杯中,使用Amaza Nucleofector II(Lonza公司)电转仪设定的HepG2细胞电转程序进行转染。电转后细胞用10%血清的DMEM培养基重悬,接种到实验用的细胞培养皿中。

1.2.3 细胞固定和免疫荧光 细胞经过转染后接种到预先放置细胞爬片的培养皿中进行培养。细胞经过实验处理后,吸掉培养基后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗两遍后,使用4%的多聚甲醛室温下固定细胞15min。细胞爬片用封片剂固定在载玻片上,使用尼康A1R+扫描共聚焦显微镜进行观察。

1.2.4 电镜 细胞用2.5%戊二醛固定之后,接着用0.1M磷酸缓冲液漂洗,再用1%锇酸溶液进行固定,接着经过0.1M磷酸缓冲液漂洗,乙醇溶液固定,包埋切片之后经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧钨饱和溶液染色,使用日立H-7650B电子显微镜进行样品观察。

1.2.5 实时荧光定量PCR 使用Trizol(Invitrogen公司)-三氯甲烷-异丙醇沉淀的方法提取转染siRNA 48h后的HepG2细胞内总RNA,取5 μg 总RNA作为模板使用Invitrogen Superscript反转试剂盒进行反转录得到cDNA,稀释100倍后使用ABI7500荧光定量PCR仪进行实验。使用的PCR引物(5'到3')为:Actin正向引物:CATGTACGTTGCTATCCAGGC;Actin反向引物:CTCCTTAATGTCACGCACGAT;Drp1正向引物:CTGCCTCAAATCGTCGTAGTG;Drp1反向引物:GAG-GTCTCCGGGTGACAATTC;Mff正向引物:ACTGAAG-GCATTAGTCAGCGA;Mff反向引物:TCCTGCTACAA-CAATCCTCTCC;Fis1正向引物:GTCCAAGAGCAGCA

GTTTG; *Fis1* 反向引物: ATGCCTTTACGGATGTCATCATT。

1.2.6 siRNA 序列 序列顺序为 5' 到 3' 端, *siDrp1-1#*: AAGCAGAAGAATGGGGTAAAT, *siDrp1-2#*: ACUAUUGAAGGAACUGCAAAUAUA; *siMff-1#*: AACGCTGACCTGGAACAAGGA, *siMff-2#*: CGCUGACCUGGAACAAGGA; *siFis1-1#*: AACGAGCTGGTGTCTGTGGAG, *siFis1-2#*: AAAGGCCATGAAGAAAGATGG。

1.2.7 流式细胞分析 细胞染色后进行实验处理, 消化、重悬后通过 BD Calibur 流式细胞分析仪进行 DCFH-DA 或 JC-10 的荧光强度分析。每个样品分析细胞的数目是为 10000 个。得到的原始数据经过 FlowJo VX 软件处理呈现。

1.2.8 图像处理 共聚焦显微镜获得的原始图片由 Nikon NIS-element 软件或 Image J 软件处理, 电镜图片用 Image J 软件处理。

1.3 统计学分析

所有数据使用 Graphpad Prism 5.0 软件作图。使用双尾学生 t 检验 (Two tailed student's t test) 比较不同组数据之间的差异, P 值小于 0.05 认为存在明显差异。 P 小于 0.001 时用 ***

表示。

2 结果

2.1 甜甜圈线粒体和球状线粒体的产生

正常培养的 HepG2 细胞中, 线粒体呈现短棒状^[31] (图 1A)。在经过 HBSS 饥饿处理 2 h 之后, 细胞中形成大量超长管状的线粒体 (图 1B), 说明线粒体发生高度融合 (Hyperfusion)^[31, 32]。HBSS 饥饿处理后的 HepG2 细胞经过解偶联剂 CCCP 处理 0.5 h 后, 产生大量甜甜圈线粒体 (图 1B), 这种外形类似 "甜甜圈" 的线粒体结构被认为与线粒体功能障碍相关^[19]。与 CCCP 类似, 脂肪酸受体 GPR40/120 激动剂 GW9508 处理也使细胞中产生大量的甜甜圈线粒体 (图 1B)。不同的是, OA 处理后, 细胞中出现数目庞大的球状线粒体 (图 1B), 暗示线粒体发生分裂。与 OA 处理类似, Ionomycin 也能使细胞出现数目庞大的球状线粒体 (图 1B)。电镜结果进一步证实了上述表型 (图 1C)。因此, 除了改变细胞的能量状态之外^[31], CCCP、GW9508、OA 以及 Ionomycin 也可以改变线粒体形态。

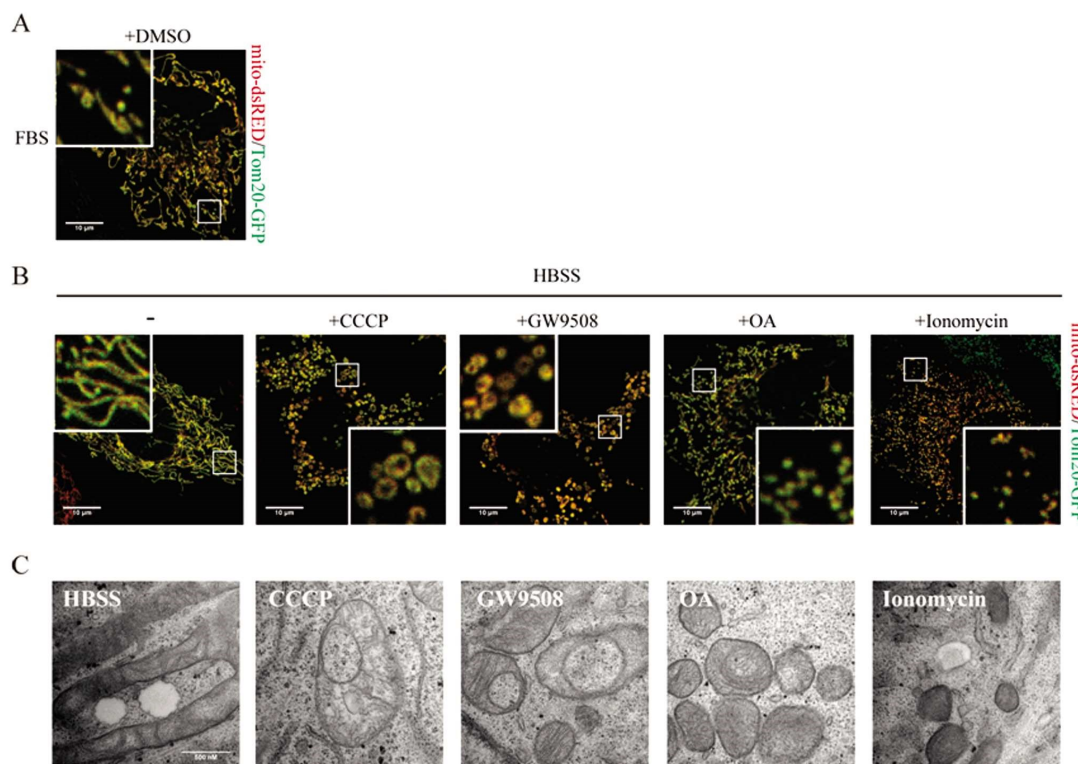


图 1 不同药物对 HepG2 细胞中线粒体形状的影响

(A 和 B) 线粒体标记蛋白 mito-dsRED 和 Tom20-GFP 染色的荧光图像, 其中 (A) 为正常 10% 血清 DMEM 培养基;

(B) 为 HBSS 培养基和不同药物处理, CCCP (50 μ M), GW9508 (200 μ M), OA (200 μ M), Ionomycin (4 μ M), 标尺 = 10 μ m;

(C) 电镜图片显示 (B) 中 HBSS 和不同药物处理下的线粒体形态, 标尺 = 500 nm。

Fig.1 Effects of different drugs on mitochondria morphology in HepG2 cells

(A and B) Fluorescence merge image stained by mito-dsRED and Tom20-GFP as mitochondria markers in normal culture cells in DMEM plus 10% FBS

(A) or in HBSS with different drugs treatments as indicated. CCCP (50 μ M), GW9508 (200 μ M), OA (200 μ M), Ionomycin (4 μ M).

Scale Bar: 10 μ m; (C) Captured TEM images showing mitochondria morphology in HBSS or drugs treated cells as in (B). Scale Bar: 500 nm.

2.2 甜甜圈线粒体和球状线粒体形成时间存在差异

进一步, 本研究使用活细胞显微镜通过实时观察, 研究这两种形态迥异的线粒体如何产生。CCCP 处理细胞之后, 线粒

体几乎立刻发生形态的改变, 原本棒状的线粒体, 一端与中间相连, 在第 35 s 开始形成环状的甜甜圈线粒体 (图 2A)。GW9508 与 CCCP 类似, 也是短棒状线粒体自行围成一个环状

的甜甜圈线粒体(图 2B)。但是与 CCCP 不同的是 GW9508 需要处理 7-8 min 之后细胞内才逐渐形成甜甜圈线粒体。而从整个形成过程来看,无论是 GW9508 还是 CCCP,甜甜圈线粒体发生到形成的时间均只需要 20 s 左右(图 2A 和图 2B)。同样是形成甜甜圈线粒体,CCCP 与 GW9508 处理细胞,线粒体形态发生改变的时间不一致性说明这两种处理对线粒体的改变仍然存在差异。另外,甜甜圈线粒体出现早而快,球状线粒体完

成慢,也进一步暗示这两种不同形态的线粒体功能或者产生机制存在着差异。

不同于甜甜圈线粒体形成的快速性,球状线粒体的发生到完成时间比较长,无论是 OA 还是 Ionomycin 处理,都需要经过 20 min,线粒体才能完成分裂的整个过程,最终形成大量球状分裂的线粒体(图 2C 和图 2D)。

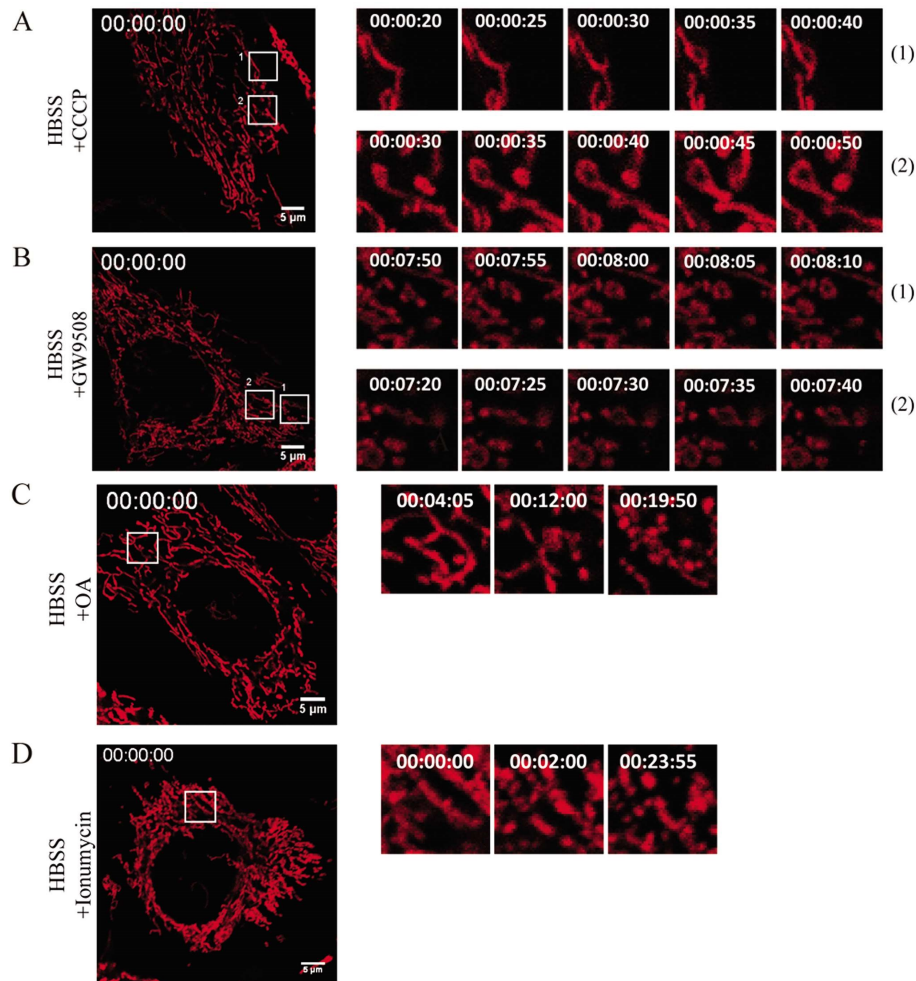


图 2 活细胞实时观察 CCCP/GW9508/OA/Ionomycin 处理导致的 HepG2 细胞中线粒体动态变化

(A-D)截图显示在 HepG2 细胞中使用活细胞延时成像并用 mito-dsRED 染色作为线粒体标记,HepG2 细胞在指定药物处理之前使用 HBSS 饥饿 2 小时。标尺 = 5 μm 。其中(A)CCCP, 50 μM ;(B)GW9508, 200 μM ;(C)OA, 200 μM ;(D)Ionomycin, 4 μM 。

Fig.2 Real-time observation of dynamic change of mitochondria morphology by CCCP/GW9508/OA/Ionomycin treatments in HepG2 cells

(A-D) Captured images stained with mito-dsRED as mitochondria marker by using live cell time-lapse imaging in HepG2 cells which were starved by HBSS for 2h before indicated drugs treatment. Scale Bar: 5 μm . (A) CCCP, 50 μM ; (B) GW9508, 200 μM ; (C) OA, 200 μM ; (D) Ionomycin, 4 μM .

2.3 四种药物处理对活性氧化簇和线粒体膜电位的影响

结果表明,CCCP、GW9508、OA 和 Ionomycin 处理 10 min 显著增加了细胞内 ROS 的水平(图 3A),其影响顺序为 CCCP>OA>GW9508>Ionomycin。由于各种试剂使用浓度不同,此处不能比较各药物活性,但其表明这些药物处理均改变了细胞内 ROS 水平,暗示氧化应激的发生^[33,34]。JC-10 染色试验表明,10% FBS 正常培养情况下,极化细胞占约 35%,非极化细胞比较约 60%。与 10% FBS 正常培养比较,HBSS 饥饿处理不影响线粒体去极化产生影响(图 3B)。CCCP 处理导致线粒体去极化细胞急剧上升(35%上升至 90%),极化细胞却很少见(图

3B),这与之之前研究是一致的^[19]。但 GW9508 处理并没有对线粒体去极化产生影响。尽管 CCCP 和 GW9508 处理均导致形成相似的甜甜圈线粒体,但它们对于线粒体膜电位的影响存在差异,这也有可能是两者甜甜圈线粒体形成开始时间差异所在。而 OA 和 Ionomycin 的处理也分别增加了大约 55%和 60%的线粒体去极化的细胞(图 3B)。

2.4 Drp1 和 Mff 参与调控线粒体形态

研究结果表明 siRNA 转染 48 小时后的细胞中,*Drp1*、*Mff* 和 *Fis1* 基因的 mRNA 水平分别降低 80-90%或以上(图 4A),表明敲降效率很高。同时,无论敲低 *Drp1*、*Mff* 还是 *Fis1* 基因,

都能使细胞产生长管状高度融合的线粒体(图 4B),与之前报道的一致^[35]。

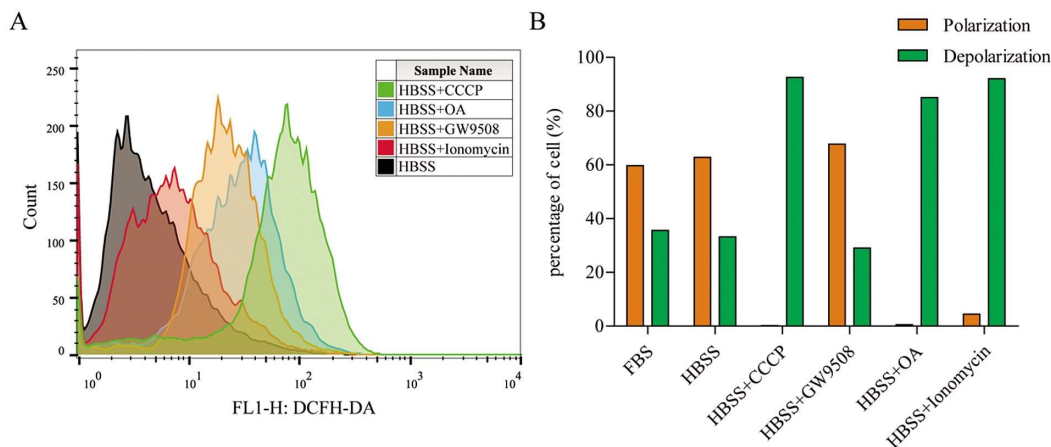


图 3 CCCP/GW9508/OA/Ionomycin 处理对活性氧 ROS 和线粒体膜电位的影响

(A) 直方图显示通过检测 DCFH-DA 荧光, CCCP (50 μ M)、GW9508 (200 μ M)、OA (200 μ M) 和 Ionomycin (4 μ M) 分别处理增加 HepG2 细胞中的 ROS; (B) 通过测量 JC-10 荧光得到的细胞百分比显示 CCCP (50 μ M)、GW9508 (200 μ M)、OA (200 μ M) 或 Ionomycin (4 μ M) 处理的 HepG2 细胞中的线粒体膜电位变化。

Fig.3 Effects of CCCP/GW9508/OA/Ionomycin treatment on ROS and mitochondrial membrane potential

(A) Histogram graph showing increased ROS measured by detecting DCFH-DA fluorescence in CCCP (50 μ M), GW9508 (200 μ M), OA (200 μ M) and Ionomycin (4 μ M) treated HepG2 cells; (B) Cell percentage showing change of mitochondrial membrane potential measured by detecting JC-10 fluorescence in CCCP (50 μ M), GW9508 (200 μ M), OA (200 μ M) and Ionomycin (4 μ M) treated HepG2 cells.

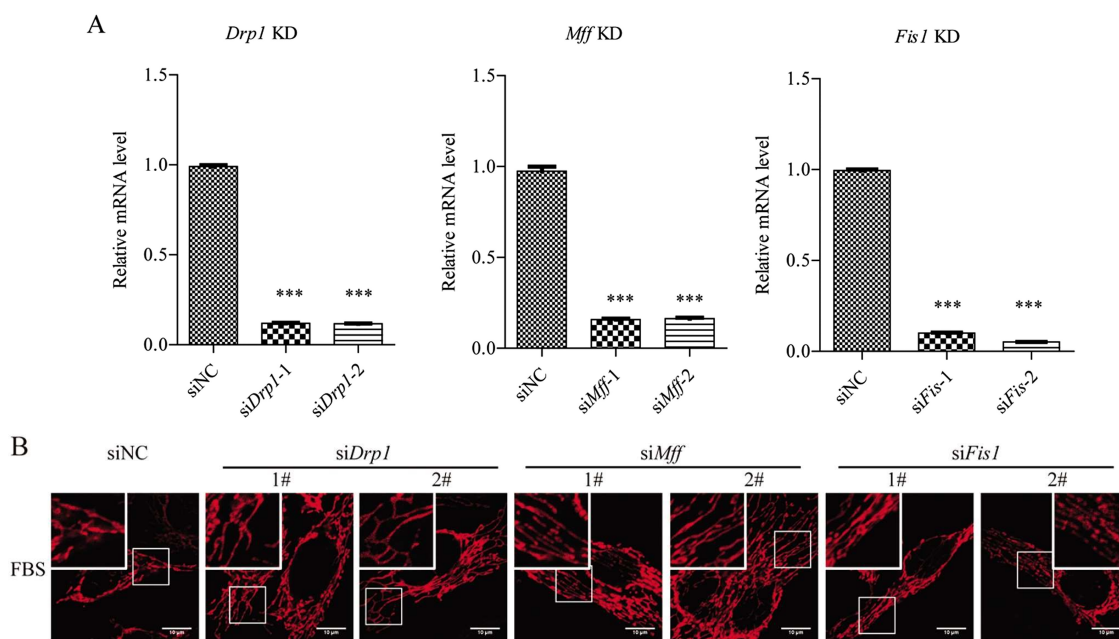


图 4 Drp1, Mff 或者 Fis1 敲低形成长管状线粒体

(A) HepG2 细胞中利用 q-PCR 测定指示基因的敲低效率。*** $P < 0.001$;

(B) 图像显示 Drp1、Mff 或 Fis1 敲低促使 HepG2 细胞中长管状线粒体的形成。

Fig.4 Long-tube mitochondria formation in Drp1, Mff or Fis1 knockdown HepG2 cells

(A) Knockdown efficiency as indicated genes in HepG2 cells by q-PCR; (B) Images showing Drp1, Mff or Fis1 knockdown induced long-tube mitochondria formation in HepG2 cells.

敲低 Drp1 能够显著抑制 CCCP 或者 GW9508 处理形成的甜甜圈线粒体, 细胞中线粒体为大量高度融合的长管状线粒体(图 5A 和 5B)。而 Mff 或者 Fis1 敲低, 均对甜甜圈线粒体产生没有影响(图 5A, 5C 和 5D)。敲低 Drp1 或 Mff 显著抑制 OA 或者 Ionomycin 处理形成的球状线粒体(图 5E, 5F 和 5G)。而

Fis1 敲低, 对球状线粒体产生没有影响(图 5E 和 5H)。这些结果显示: CCCP 和 GW9508 处理导致的甜甜圈线粒体依赖 Drp1; 与此同时, Drp1 和 Mff 对于 OA 和 Ionomycin 处理导致的球状线粒体形成至关重要。

3 讨论

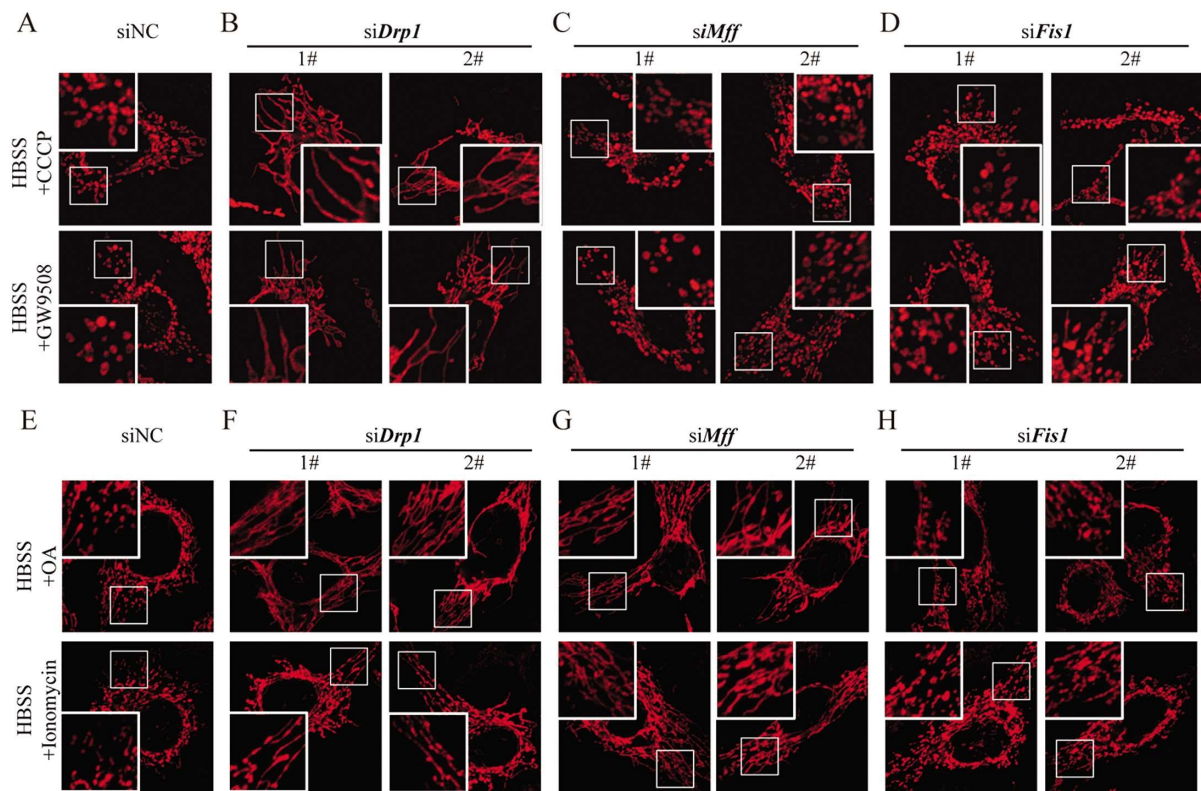


图 5 Drp1, Mff 或 Fis1 敲低对甜甜圈和球状线粒体形成的影响

(A-D)在 CCCP (50 μ M)或 GW9508 (200 μ M)处理的对照和 Drp1、Mff、Fis1 敲低 HepG2 细胞中的线粒体形态;

(E-H)在 OA (200 μ M)或 Ionomycin (4 μ M)处理的对照和 Drp1、Mff、Fis1 敲低 HepG2 细胞中的线粒体形态;

(A 和 E) 对照 siRNA 转染细胞; (B 和 F) Drp1 siRNA 转染细胞; (C 和 G) Mff siRNAs 转染细胞; (D 和 H) Fis1 siRNA 转染细胞。

Fig.5 Effects of Drp1, Mff or Fis1 knockdown on Donut and Ball mitochondria formation

(A-D) Mitochondria morphology in control and Drp1/Mff/Fis1 knockdown HepG2 cells with CCCP (50 μ M) or GW9508 (200 μ M) treatment;

(E-H) Mitochondria morphology in control and Drp1/Mff/Fis1 knockdown HepG2 cells with OA (200 μ M) or Ionomycin (4 μ M) treatment;

(A and E) control siRNA transfected cells; (B and F) Drp1 siRNAs transfected cells; (C and G) Mff siRNAs transfected cells;

(D and H) Fis1 siRNAs transfected cells.

本研究利用氧化磷酸化解偶联剂 CCCP、油酸、脂肪酸受体 GPR40/GPR120 激动剂 GW9508 以及钙离子载体 Ionomycin 等四种药物处理 HBSS 饥饿处理之后的 HepG2 细胞,应用活细胞共聚焦显微镜和电镜的手段观察细胞中线粒体形态的动态变化。并且还通过使用小分子染料,利用流式细胞分析的方式检测 CCCP、GW9508、OA 和 Ionomycin 等处理分别对线粒体 ROS 和膜电位的影响,分析线粒体形态和其功能之间的联系。本研究通过使用 siRNA 敲低 Drp1、Mff 或 Fis1 的方式,进一步研究线粒体形状动态变化过程中潜在的分子机制。

首先,本研究所使用的氨基酸和血清饥饿(HBSS 缓冲液处理)能够在 HepG2 细胞中显著改变线粒体形态,细胞中会积累大量高度融合的长管状线粒体(图 1A, 1B 和 1C),这一结果与之前的研究一致^[31]。本研究主要关注的线粒体功能包括氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation, OXPHOS),脂肪酸 β -氧化(β -oxidation)和钙离子稳态^[1, 36]。CCCP 是研究线粒体功能常用的解偶联剂,使用 CCCP 处理导致细胞中产生大量甜甜圈线粒体(图 1B 和 1C),这与之前的报道相同^[9]。本研究还发现甜甜圈线粒体的产生过程仅需 20 s,这是一个非常动态的过程(图 2A)。另外,饥饿处理后的细胞经过 OA 处理后导致线粒体分裂成球状,这一过程相对缓慢,需要经历 20 min (图 1A, 1B 和

2C)。脂肪酸除了作为能源物质之外,还可以结合脂肪酸受体通过信号的方式调节细胞内活动。与 OA 处理不同的是,使用脂肪酸受体 GPR40/120 激动剂 GW9508 处理细胞,产生的是甜甜圈线粒体而非球状线粒体,并且从开始到甜甜圈形成所需要的时间只需要 20 s(图 1B, 1C 和 2B)。而 GW9508 作为脂肪酸受体激动剂,需要一段时间借助受体传递信号,从而改变细胞中某些信号通路^[37]。因此, GW9508 处理在 7 min 后才开始形成甜甜圈线粒体,明显与 CCCP 所导致的甜甜圈线粒体存在差异。钙离子载体 Ionomycin 处理细胞能够提高细胞胞浆和线粒体中钙离子浓度^[38]。Ionomycin 处理的细胞中产生分裂的线粒体(图 1B, 1C 和 2D)与 OA 处理类似, Ionomycin 一方面使线粒体去极化,另一方面 ROS 水平也有一定程度的提高(图 3A 和 3B)。本研究发现 GW9508 与 CCCP 处理均可形成相似的甜甜圈线粒体,然而,其开始形成的时间明显晚于 CCCP 处理,并且 GW9508 并未在使用中明显改变线粒体膜电位,这与 CCCP 导致的线粒体去极化存在显著差异。OA 和 Ionomycin 在本研究中的使用证明脂肪酸和钙离子对线粒体的调控,两者都能够使细胞中线粒体分裂,并导致线粒体去极化和 ROS 的升高,这一结果与之前报道的线粒体分裂是 ROS 增加的先决条件是一致的^[26, 27]。

本研究试图从参与调控线粒体形态的蛋白分子的角度出发,研究甜甜圈线粒体和球状线粒体产生的机制。线粒体相关蛋白 Drp1, Mff, Fis1 已被报道参与线粒体的分裂过程。Mff 和 Fis1 作为膜蛋白可以作为 Drp1 的结合蛋白招募 Drp1 定位线粒体外膜分裂线粒体^[35]。研究中发现敲低这三个基因都能使 HepG2 细胞中产生高度融合的长管状线粒体(图 4A 和 4B),进一步证实这三个蛋白能够调控线粒体分裂。接着,试验发现只有敲低 Drp1 能够抑制 CCCP 或者 GW9508 处理导致的甜甜圈线粒体的形成(图 5B)。因此,Drp1 可能通过其他线粒体上的受体而非 Mff 或者 Fis1 调控 CCCP/GW9508 导致的甜甜圈线粒体(图 5C)。同样,OA 或者 Ionomycin 处理导致的球状线粒体可以通过敲低 Drp1 或者 Mff 抑制(图 5F 和 5G)。因而,OA 或者 Ionomycin 处理可能通过招募 Drp1 和其受体 Mff 结合,参与线粒体切割和分裂,这都与高糖压力下导致线粒体分裂的报道非常一致^[26,27]。另外,有报道认为,高糖压力下产生过量的 ROS 能够进一步激活阳离子通道 TRPM2,导致钙离子浓度上升,从而导致溶酶体通透性的改变以及溶酶体锌离子再分布到线粒体中。线粒体中的锌离子有进一步招募 Drp1 蛋白,最终导致了线粒体分裂^[39],因而 Ionomycin 也很有可能通过这种方式调控线粒体分裂。最近的研究还发现,AAC1 介导的脂肪酸的从头合成通过稳定 Fis1 导致线粒体分裂维持干细胞的多能性以及诱导性多能干细胞的形成。同时,该研究还报道了正常培养条件下的细胞经过油酸(OA)处理后线粒体发生分裂,与线粒体分裂相关的 Drp1 和 Fis1 蛋白水平显著增加^[40]。这些现象均说明在高营养--高糖或者高脂肪酸(OA 加入)的条件下,细胞可能需要通过线粒体分裂的方式来应对这种压力。

本研究主要发现脂肪酸及其受体激动剂以及钙离子能够调控线粒体形态,导致甜甜圈线粒体和球状线粒体的形成,并且这两种线粒体形态的发生均依赖于 Drp1,但其中的具体分子机制上仍然存在着差异。CCCP/GW9508 处理导致的甜甜圈线粒体,以及 OA/Ionomycin 处理导致的球状线粒体,具体通过什么机制,如何调控 Drp1 的功能需求,是否改变 Drp1 的磷酸化水平^[17,41]仍需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Mishra P, Chan D C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics [J]. J Cell Biol, 2016, 212(4): 379-387
- [2] Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation [J]. Trends Endocrin Met, 2016, 27(2): 105-117
- [3] Spinelli J B, Haigis M C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(7): 745-754
- [4] Montava-Garriga L, Singh F, Ball G. Semi-automated quantitation of mitophagy in cells and tissues [J]. Mech Ageing Dev, 2020, 185: 111196
- [5] Wallace D C, Singh G, Lott M T, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. Science, 1988, 242(4884): 1427-1430
- [6] Morris A A M, Leonard I V, Brown G K, et al. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease[J]. Ann Neurol, 1996, 40(1): 25-30
- [7] Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health [J]. Cell, 2012, 148 (6): 1145-1159
- [8] Bratic A, Larsson N G. The role of mitochondria in aging [J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 951-957
- [9] Carey B W, Finley L W, Cross J R, et al. Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells[J]. Nature, 2015, 518(7539): 413-416
- [10] Sun N, Youle R J, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging[J]. Mol Cell, 2016, 61(5): 654-666
- [11] Labbe K, Murley A, Nunnari J. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior[J]. Annu Rev Cell Dev Bi, 2014, 30: 357-391
- [12] Mourier A, Motori E, Brandt T, et al. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels [J]. J Cell Biol, 2015, 208 (4): 429-442
- [13] Eisner V, Lenaers G, Hajnoczky G. Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling [J]. J Cell Biol, 2014, 205(2): 179-195
- [14] Mishra P, Carelli V, Manfredi G, et al. Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation [J]. Cell Metab, 2014, 19 (4): 630-641
- [15] Baker M J, Lampe P A, Stojanovski D, et al. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics[J]. Embo J, 2014, 33(6): 578-593
- [16] Kashatus J A, Nascimento A, Myers L J, et al. Erk2 Phosphorylation of Drp1 Promotes Mitochondrial Fission and MAPK-Driven Tumor Growth[J]. Mol Cell, 2015, 57(3): 537-551
- [17] Wikstrom J D, Mahdavian K, Liesa M, et al. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure [J]. Embo J, 2014, 33 (5): 418-436
- [18] Pham T D, Pham P Q, Li J F, et al. Cristae remodeling causes acidification detected by integrated graphene sensor during mitochondrial outer membrane permeabilization[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35907
- [19] Miyazono Y, Hirashima S, Ishihara N, et al. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner[J]. Sci Rep, 2018, 8: 350
- [20] Ong S B, Hausenloy D J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(1): 16-29
- [21] Galloway C A, Yoon Y. Mitochondrial morphology in metabolic diseases[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(4): 415-430
- [22] Ong S B, Subrayan S, Lim S Y, et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2010, 121(18): 2012-2022
- [23] Friedman J R, Nunnari J. Mitochondrial form and function[J]. Nature, 2014, 505(7483): 335-343
- [24] Jahani-Asl A, Pilon-Larose K, Xu W, et al. The mitochondrial inner membrane GTPase, optic atrophy 1 (Opa1), restores mitochondrial morphology and promotes neuronal survival following excitotoxicity [J]. J Biol Chem, 2011, 286(6): 4772-4782
- [25] Lee Y J, Jeong S Y, Karbowski M, et al. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in

- apoptosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11): 5001-501
- [26] Yu T, Robotham J L, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(8): 2653-2658
- [27] Yu T, Sheu S S, Robotham J L, et al. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(2): 341-351
- [28] Picard M, Shiriha O S, Gentil B J, et al. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 304(6): R393-406
- [29] Zhang W J, Hu X L, Shen Q, et al. Mitochondria-specific drug release and reactive oxygen species burst induced by polyprodrug nanoreactors can enhance chemotherapy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1704
- [30] Liu R T, Li X W. Radix Ophiopogonis polysaccharide extracts alleviate MPP⁺-induced PC-12 cell injury through inhibition of Notch signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(1): 99-109
- [31] Rambold A S, Kostecky B, Elia N, et al. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(25): 10190-10195
- [32] Gomes L C, Di Benedetto G, Scorrano L. Essential amino acids and glutamine regulate induction of mitochondrial elongation during autophagy[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(16): 2635-2639
- [33] Frijhoff J, Winyard P G, Zarkovic N, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2015, 23(14): 1144-1170
- [34] Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 757-772
- [35] Loson O C, Song Z Y, Chen H C, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(5): 659-667
- [36] Picard M, McEwen B S. Mitochondria impact brain function and cognition[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(1): 7-8
- [37] Wauquier F, Philippe C, Leotoing L, et al. The Free Fatty Acid Receptor G Protein-coupled Receptor 40 (GPR40) Protects from Bone Loss through Inhibition of Osteoclast Differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6542-6551
- [38] Nakamura S, Nakanishi A, Takazawa M, et al. Ionomycin-induced calcium influx induces neurite degeneration in mouse neuroblastoma cells: analysis of a time-lapse live cell imaging system [J]. *Free Radical Res*, 2016, 50(11): 1214-1225
- [39] Abuarab N, Munsey T S, Jiang L H, et al. High glucose-induced ROS activates TRPM2 to trigger lysosomal membrane permeabilization and Zn²⁺-mediated mitochondrial fission [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(490): eaal4161
- [40] Wang L H, Zhang T, Wang L, et al. Fatty acid synthesis is critical for stem cell pluripotency via promoting mitochondrial fission [J]. *Embo J*, 2017, 36(10): 1330-1347
- [41] Otera H, Wang C X, Cleland M M, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(6): 1141-1158

• 重要信息 •

《现代生物医学进展》2020 年封面设计说明

美国癌症学家威廉·凯林(William G. Kaelin Jr),英国医学家彼得·拉特克利夫(Sir Peter J. Ratcliffe)和美国医学家格雷格·塞门扎(Gregg L. Semenza)共享了 2019 年诺贝尔生理学或医学奖,他们发现了细胞如何感知并适应氧气变化的含量,证实存在调控基因活性的分子机器,从而响应于不同水平的氧气,这些开创性的发现揭示了生命最重要的适应过程之一。

本刊 2020 年度的封面设计紧贴上述诺贝尔奖项的主题,封面主体为气泡构成的氧气分子式,表现了氧分子与生命之间的密切联系。此版封面设计主题突出,色彩简约明了,一如既往的体现了《现代生物医学进展》始终与生物医学学科发展前沿衔接的办刊主旨和特色。