

文章编号: 1004-0374(2012)02-0198-07

# 线粒体疾病小鼠模型的建立及病理生理学研究

方芳<sup>1</sup>, 管敏鑫<sup>1,2\*</sup>

(1温州医学院, Attardi线粒体生物医学研究院和浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; 2浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

**摘要:** 线粒体疾病是机体 ATP 合成障碍、供能不足引起的多系统疾病。近十年来, 随着线粒体疾病小鼠模型的不断建立和完善, 发现核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 或 (和) 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 突变造成线粒体氧化磷酸化功能缺陷是其发病的主要原因。将着重介绍线粒体氧化磷酸化功能缺陷导致线粒体疾病的小鼠模型的建立及其病理生理学特点。

**关键词:** 线粒体疾病; 氧化磷酸化缺陷; 小鼠模型; 突变

**中图分类号:** R589; R363 **文献标志码:** A

## Mouse models of mitochondrial disease and their pathophysiology

FANG Fang<sup>1</sup>, GUAN Min-Xin<sup>1,2\*</sup>

(1 Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Mitochondrial disease is a kind of multi-system disease, resulting from energy shortage by ATP synthesis defect. As the development of mitochondrial disease mouse model during the past decade, nuclear DNA or (and) mitochondrial DNA mutations have been confirmed to be the main reasons to cause defects in mitochondrial oxidative phosphorylation for the diseases. In this review, we will focus on the characteristic of the mitochondrial disease mouse models and their pathophysiology.

**Key words:** mitochondrial diseases; oxidative phosphorylation defects; mouse model; mutation

线粒体疾病 (mitochondriopathy) 是指因遗传缺损引起线粒体代谢酶缺陷, 导致 ATP 合成障碍、能量来源不足而出现的一组多系统疾病<sup>[1]</sup>。由于线粒体在机体供能、产生活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 以及细胞凋亡等一系列生命活动中占据着核心地位, 以致普遍认为作为线粒体主要供能系统的氧化磷酸化系统 (oxidative phosphorylation system, OXPHOS) 功能紊乱是线粒体疾病发生的重要环节。核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 突变、线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 突变及两者间的相互作用均可导致 OXPHOS 功能紊乱, 使得 ROS 产生增加, 进一步加剧细胞 mtDNA 突变和 OXPHOS 功能损害。

20 世纪初, 人们在研究小鼠生殖过程中产生的编码 OXPHOS 的 nDNA<sup>[2]</sup> 和 mtDNA 缺陷时, 猜

测 OXPHOS 功能缺陷、mtDNA 缺失、编码线粒体蛋白的 nDNA 发生突变可能与某些疾病有着紧密联系<sup>[3-5]</sup>。随着对人类线粒体缺陷疾病认识的逐步深入, 以及线粒体疾病小鼠模型的不间断建立和完善, 上述观点逐步得到了证实<sup>[6]</sup>。本文简要介绍线粒体 OXPHOS 系统及其生物学功能以及线粒体相关疾

收稿日期: 2011-09-09; 修回日期: 2011-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070794); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2004CCA02200); 浙江省重大科技专项社会发展项目(2007C13021); 2011年浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)立项资助项目(2011R413033); 温州市科技局项目(Y20080122); 浙江省卫生厅项目(2009A135)

\*通信作者: E-mail: gminxin88@gmail.com; Tel: 0571-88206497

病,并详细阐述一些目前已建立的线粒体疾病小鼠模型及其病理生理特点。

## 1 线粒体OXPHOS系统及其生物学功能

### 1.1 OXPHOS酶系

组成线粒体的多肽大部分由 nDNA 编码,但 mtDNA 依然保留了 13 个核心的编码 OXPHOS 多肽的基因。因此,线粒体基因组同时包含了 nDNA 和 mtDNA,且需要两者共同协作来合成有功能的线粒体 OXPHOS 系统。

线粒体通过 OXPHOS 将葡萄糖、脂肪等进行有氧氧化并以 ATP 的形式提供生命活动所需的绝大部分能量。氧化磷酸化相关的蛋白质位于线粒体内膜,包括电子传递链(electron transfer chain, ETC)成分、ATP 合成酶、腺嘌呤核苷酸转运子(ANTs)。ETC 氧化有机酸(如丙酮酸、脂肪酸)得到的氢与氧原子结合生成水,此过程中产生的电子需要 NADH 脱氢酶(复合酶 I)、复合酶 II(琥珀酸脱氢酶)、复合酶 III(泛醌细胞色素 C 氧化还原酶)、细胞色素 C、复合酶 IV(细胞色素 C 氧化酶, COX) 作为电子载体。形成的质子流驱动 ADP 与 Pi 合成 ATP,运输到胞质,通过 ANTs 对基质和胞质中的 ATP 与 ADP 进行转换<sup>[7]</sup>。

### 1.2 活性氧簇(ROS)

线粒体 OXPHOS 系统除为机体供能以外,还可产生 ROS。当 ETC 转运的电子大幅度减少时,多余的电子与线粒体内膜基质侧的氧直接通过复合酶 I 或复合酶 III 与线粒体内膜胞质侧的 O<sup>2</sup> 结合,分别在基质或膜间隙中生成超氧阴离子(O<sup>2•-</sup>)。通过复合酶 I 生成的基质超氧阴离子(O<sup>2•-</sup>),经胞质中特有的,由 nDNA *Sod2* 基因编码的锰超氧化物歧化酶(MnSOD)作用转变成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。通过复合酶 III 生成的膜间隙 O<sup>2•-</sup> 则通过膜间隙和胞质中的 Cu/Zn SOD (SOD1) 转变成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。线粒体中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可扩散到细胞核中。基质、膜间隙、胞质或细胞核中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 遇到活性金属离子或与 O<sup>2•-</sup> 结合, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进一步被还原成活性氧簇中最有活性的基团——羟基。在正常生理条件下,ROS 的产生受到高度的调控<sup>[8-9]</sup>。当呼吸链受到抑制时,过多的电子便会聚集在 ETC 转运体上导致 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的生成增加。随着时间的积累,过多的 ROS 产物将导致细胞凋亡或者坏死。

### 1.3 线粒体OXPHOS系统的主要相关功能

#### 1.3.1 ADP/ATP转换

线粒体内的 ATP 通过内膜上的 ANTs 与胞质中

的 ADP 进行交换。人类拥有四种 ANT 亚型: ANT1 主要在心脏和骨骼肌中表达, ANT2 主要在快速生长的细胞中表达且容易被诱导, ANT3 几乎在所有组织中均有表达, ANT4 主要在睾丸中表达。小鼠拥有三种 *Ant* 基因: *Ant1* 主要在心脏和骨骼肌中表达, *Ant2* 在骨骼肌以外的组织中均有表达, *Ant4* 主要在睾丸中表达<sup>[10-11]</sup>。

#### 1.3.2 线粒体通透性转换孔(mtPTP)

mtPTP 是线粒体的一套自毁系统,其确切的作用机理及结构目前还不完全清楚。现在普遍认为 mtPTP 是一个由 ANT 蛋白和电压依赖性阴离子通道蛋白(VDAC)组成的复杂系统,与其他次要受体相互作用共同调节机体活动。mtPTP 被激活后通过开放线粒体内膜上的一个通道降低  $\Delta P$  并诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.3 线粒体动力学

哺乳动物细胞内的线粒体始终在不断运动,经历着循环往复的融合和分裂。该过程不仅包括线粒体内外膜的融合,也包括线粒体基质混合和 mtDNA 的重新分配。哺乳动物线粒体融合相关蛋白主要包括线粒体融合蛋白 1(Mfn1)、线粒体融合蛋白 2(Mfn2) 以及视神经萎缩蛋白 1(Opa1),分裂相关蛋白主要包括分裂启动相关蛋白 1(Drp1)、分裂促进蛋白 1(Fis1) 以及线粒体分裂因子(Mff)<sup>[13-15]</sup>。

## 2 线粒体疾病

目前,超过 200 种致病的 mtDNA 碱基突变被鉴定出来。这些疾病的临床表型非常广泛,包括线粒体脑肌病、线粒体肌病、胃肠综合征、肌张力障碍、糖尿病、耳聋、心肌病、阿尔茨海默病、帕金森病以及亨廷顿氏舞蹈病<sup>[16-19]</sup>。

大部分的线粒体疾病患者通常伴有两个或多个基因的缺失(即基因间突变),并且这些突变通常不会遗传。这一类疾病包括慢性进行性眼外肌麻痹、Pearson 骨髓/胰腺综合征和 Kearns-Sayre 综合征<sup>[18]</sup>。

导致大部分母系遗传线粒体疾病的基因突变通常只涉及基因内部一个或几个碱基对的改变(即基因内突变)。这一类疾病包括 *ND4* 基因上的 A11778G 错义突变引起的 Leber 氏遗传性视神经病<sup>[20]</sup>; tRNA<sup>lys</sup> 基因上的 A8344G 突变所致的肌阵挛癫痫和破碎红纤维病<sup>[21-22]</sup>; tRNA<sup>leu(UUR)</sup> 基因上的 A3243G 突变所致的线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(MELAS)综合征<sup>[23]</sup>; *ATPase6* 上 T8993G 基因突变导致 L156P 位的氨基酸替换所致的神经共济失调-

视网膜色素变性病以及亚急性坏死性脑病<sup>[24]</sup>等。

mtDNA 突变还可能与癌症有关。在肾腺癌、结肠细胞癌、星型胶质细胞瘤、甲状腺瘤、乳腺肿瘤以及前列腺肿瘤中均有关于体细胞或生殖细胞 mtDNA 突变的报道<sup>[25-26]</sup>。

### 3 基因突变相关线粒体疾病小鼠模型

许多 nDNA 编码的基因突变所导致线粒体 OXPHOS 疾病可以通过建立小鼠模型在小鼠身上体现出来。目前有关此类基因突变的小鼠模型的报道主要包括 ADP/ATP 的载体基因 *Ant1-4*，复合物 I 的结构基因 *Ndufs4*，电子载体基因细胞色素 C(*cytc*) 和复合物 IV 的装配基因 *Surf1* 和 *Cox10*，修饰线粒体的抗氧化基因 *Gpx 1*、*Sod 1* 和 *Sod 2*，线粒体融合基因 *Mfn1*、*Mfn2* 和 *Opal*，线粒体生源基因 *Polg*、*Twinkle*、*Tfam* 和 *Mterf3* 等。与 nDNA 编码基因突变线粒体疾病小鼠模型的高速发展相比，mtDNA 编码的基因突变所导致线粒体疾病的研究却由于修饰小鼠线粒体 mtDNA 基因的相应技术不成熟而仍然处于瓶颈期。目前已建立的少部分 mtDNA 变异小鼠模型包括：异质性 4 696 bp 重排、线粒体 16S rRNA T2433C 突变、线粒体 ND6 编码区 13 885 位点插入碱基 C 导致移码突变和线粒体 COI 编码区 T6589C 错义突变等的小鼠模型。

#### 3.1 nDNA 编码 OXPHOS 修饰基因失活小鼠模型

##### 3.1.1 *Ant* 基因失活小鼠模型

通过使 *Ant* 基因失活，可以限制机体组织和器官中线粒体所产生 ATP 的输出，最终导致机体组织和器官功能受到影响。*Ant1* 基因失活的小鼠骨骼肌细胞中 *Ant* 完全缺失，线粒体呈现大量增殖，肌纤维琥珀酰胆碱染色 (SDH 染色) 和 COX 染色增强，这些症状都与线粒体肌病的症状吻合。同时，小鼠心脏由于心肌细胞内线粒体增殖导致肥厚性心脏病<sup>[2]</sup>。睾丸特异性腺苷酸转运异构体 *Ant4* 基因失活时<sup>[27]</sup>，会引起小鼠生精障碍<sup>[11]</sup>。虽然精子早期产生的一般标记基因 *Dazl* 和 *Dmc1* 都能够正常表达，但后期产生的标记基因 *A-Myb*、*Dvl3*、*Sycp3* 显著性降低，且精母细胞中的标记基因 *HoxA 4* 和 *Cyclin A1* 均检不出。通过原位末端转移酶标记技术 (TUNEL 标记) 和半胱天冬酶 -3 染色的方法可检测到凋亡的精母细胞。睾丸中 *Ant2* 基因表达上调可以为早期精子形成提供充足的能量。然而，在精子形成的 17 d，精母细胞数量显著下降，说明超过这个发育时段后必须由线粒体为精子发育提供能量<sup>[11]</sup>。

##### 3.1.2 *Ndufs4* 结构基因失活小鼠模型

*Ndufs4*<sup>-/-</sup> 的小鼠呼吸复合物 I 会出现部分损伤。在出生 30 d 内，*Ndufs4*<sup>-/-</sup> 小鼠仅表现为体积较对照组小，其他无异常。30 d 后开始出现嗜睡症状，体温下降 2 °C 左右。观察其视网膜电图，发现它们对 B 波不敏感，不能达到视觉阈值。第 35 天开始，小鼠出现惊恐反应，并出现较严重的共济失调症。在 35~50 d 内，体重停止增加，发展为更加严重的共济失调症，最终死亡。此小鼠的肝线粒体中，依赖复合物 I 进行的呼吸过程速率下降超过了 50%，但依赖复合物 II 或 IV 进行的呼吸过程没有受到影响。组织化学分析法观察小鼠肌肉组织，复合物 I 的活性明显降低，而复合物 II 或 IV 的活性不受影响，其形态学和线粒体的超微结构亦无改变<sup>[28]</sup>。*Ndufs4* 基因失活的小鼠出现 Leigh 综合征表型。

##### 3.1.3 细胞色素 C(*cytc*) 基因失活小鼠模型

*cytc*<sup>-/-</sup> 小鼠在怀孕的 10.5 d (E10.5)，胚胎死亡。即使使用大剂量的生长阻滞剂，也只能怀孕到 E8.5，即胚胎三胚层完全出现的阶段<sup>[29]</sup>。培养 E8.5 胚胎细胞，在培养基中添加尿苷酸和丙酮酸盐，细胞长势极好<sup>[30]</sup>。*cytc*<sup>-/-</sup> 细胞中，NF- $\kappa$ B、PI3/Akt 和 JNK 信号转导通路没有激活，在 TNF $\alpha$  蛋白作用下细胞的死亡受体通道极度活跃。*cytc*<sup>-/-</sup> 细胞对癌基因抑活药物、UV 照射和血清培养等细胞凋亡诱导剂导致的细胞凋亡过程有抵抗力。同时伴有 DNA 断裂、染色质凝聚且不能产生凋亡相关蛋白 Apaf-1、cyt c 和 procaspase-9<sup>[29]</sup>。*cytc*<sup>-/-</sup> 小鼠模型显示线粒体 ETC 在提供维持细胞生长所必需 ATP 的产生过程并不是必需的，但在调控细胞生长、分化、细胞凋亡过程中发挥着重要的作用。

##### 3.1.4 *Surf1* 基因失活小鼠模型

COX 装配基因即 *Surf1* 基因失活的小鼠，用一个新霉素抗性基因段取代外显子 5~7 位点的任一基因就可以产生小鼠模型 *Surf1*<sup>Neo-/-</sup><sup>[31]</sup> 或插入一个 *loxP* 基因序列到第 7 位外显子位置，在氨基酸 225 位点产生一个终止子产生小鼠模型 *Surf1*<sup>loxP-/-</sup><sup>[32]</sup>。

*Surf1*<sup>loxP-/-</sup> 小鼠无胚胎致死性，幼鼠保持正常存活率。出生时体重较轻，断奶后会逐渐恢复正常体重。不同组织中，COX 活性下降了 50%~70%；装配量也显著降低。此小鼠无神经损伤，但对 Ca<sup>2+</sup> 介导的兴奋毒性脑损伤显示出耐受性。离体培养单个 *Surf1*<sup>loxP-/-</sup> 小鼠神经元细胞，发现谷氨酸诱导的胞质 Ca<sup>2+</sup> 流下降，从而会导致细胞死亡。*Surf1*<sup>loxP-/-</sup> 小鼠线粒体形态和线粒体膜蛋白均正常<sup>[32]</sup>。



*Surf1*<sup>Neo/-</sup>小鼠约90%有胚胎致死性。存活的小鼠在跑步和抓举实验中观测到肌肉活动、协调能力、肌肉强度和耐受力上均有下降。无论雄性雌性*Surf1*<sup>Neo/-</sup>小鼠生育力都下降。在不同的组织中COX的装配活性降低到正常情况下的23%~40%。*Surf1*<sup>Neo</sup>基因的失活并没有影响个体COX亚单位的表达水平,但COX基因的装配量显著降低,装配的中间物显著性增加。故当观察到COX基因的装配量和活性降低,小鼠有显著表型变化时,可以猜测*Surf1*基因失活产生的新蛋白对机体是有毒害作用的。

### 3.1.5 Cox10基因失活小鼠模型

在小鼠肌肉、神经元或肝细胞中可以选择性使COX装配基因——*Cox10*失活<sup>[5,33-35]</sup>。已在一些儿童患者中发现肝细胞中特异性*Cox10*失活。*Cox10*基因失活小鼠的体重与运动性会下降,在45~65 d内会死亡。它们的肝功能严重受损,COX活性下降,SHD活性上升,线粒体增殖,体内脂质累积,储藏糖原减少,ATP水平降低<sup>[34]</sup>。

## 3.2 nDNA抗氧化基因失活小鼠模型

通过遗传手段使小鼠的*Sod1*、*Sod2*或者*Gpx1*基因失活的方法来改变小鼠线粒体抗氧化基因最终达到改变小鼠的表型的实验已经成功。

### 3.2.1 Sod1基因失活小鼠模型

Cu/ZnSOD(*Sod1*)基因失活小鼠,在发育和成熟早期无明显的异常表型出现,但小鼠的寿命会变短。在3~6个月时,*Sod1*<sup>-/-</sup>小鼠体内MnSOD活性增加24%;胞质中顺乌头酸酶活性下降到72%,数量下降了75%之多<sup>[36]</sup>;肝脏大面积受到氧化损伤。20月龄时,肝细胞中线粒体和脂褐质颗粒数量显著上升,出现肝癌症状。同时由于硫黄色颗粒增加,视网膜功能退化,Bruch膜增厚,脉络膜上心血管形成,与衰老相关的关键因素视网膜黄斑变性开始在小鼠中出现<sup>[37-38]</sup>。这些异常现象的发生都与视网膜上皮细胞的氧化损伤增加及β-连环蛋白介导细胞完整性受到破坏有关<sup>[37]</sup>。

### 3.2.2 Sod2基因失活小鼠模型

MnSOD(*Sod2*)基因失活的小鼠较之*Sod1*<sup>-/-</sup>小鼠出现了一些更严重的病症<sup>[39-41]</sup>。两只不同品系的*Sod2*基因突变小鼠:一只CD1小鼠<sup>[39]</sup>,一只C57BL6/J2(B6)小鼠<sup>[40]</sup>。出生8 d后*Sod2*<sup>-/-</sup>CD1小鼠出现扩张型心肌病;随后,肝脏中出现大面积脂质沉积,心脏和脑中线粒体顺乌头酸酶完全失活<sup>[39]</sup>。心脏供能不足,最终导致心脏扩张直至衰竭<sup>[42]</sup>。*Sod2*<sup>-/-</sup>B6小鼠大神经元的基底神经节和脑干机能退化,18 d

后此小鼠死亡<sup>[40]</sup>。两个品系的小鼠出现完全不同的症状,可能是由于B6小鼠体内烟酰胺核苷酸转氢酶基因缺乏造成的<sup>[43-44]</sup>。

### 3.2.3 Gpx1基因失活小鼠模型

*Gpx1*基因失活的小鼠,线粒体供能锐减。*Gpx1*蛋白在肝脏、大脑、肾皮质部位大量表达,但心脏和骨骼肌中表达量较少。*Gpx1*<sup>-/-</sup>小鼠能存活下来,但是体重仅为正常小鼠的80%,生长发育迟缓。肝脏中的线粒体产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的量较野生型小鼠多四倍之多,而心脏中线粒体产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的量与野生型小鼠保持一致<sup>[45]</sup>,可能是由于心脏中含有过氧化氢酶的缘故<sup>[46-47]</sup>。*Gpx1*<sup>-/-</sup>小鼠肝脏中线粒体的呼吸控制率和能量输出仅为原来的三分之一,但心脏中的线粒体这些方面都没有什么变化<sup>[45]</sup>。

## 3.3 mtPTP基因失活小鼠模型

可以通过使小鼠体内编码*Ant*、*Vdac*和环孢霉素-D(*Pipf*)的基因失活<sup>[48-52]</sup>的方法来研究mtPTP蛋白的结构和功能,但是得到的结果与以前预测的经典mtPTP蛋白模型不相符<sup>[12]</sup>。

培养*Ant1*基因和*Ant2*基因去除的小鼠肝细胞可以观察到细胞凋亡过程的进行。即使小鼠肝细胞线粒体中的*Ant*基因被去除,mtPTP过程仍然能够通过增加Ca<sup>2+</sup>浓度和降低ΔP来诱导mtPTP蛋白的转移,最终导致线粒体内膜ΔP的变化和线粒体的肿胀。因此,在*Ant*基因完全缺失的细胞中mtPTP过程仍然能够进行,这就说明*Ant*基因并不是线粒体内膜通道的唯一编码基因。

使所有的VDAC基因失活也不能达到去除mtPTP蛋白的目的。*VDAC2*基因失活会有胚胎致死性<sup>[49]</sup>,*VDAC1*和*VDAC3*基因失活的小鼠胚胎正常<sup>[50]</sup>,但成年的小鼠会出现肌肉组织受损和细胞超微结构异常的现象<sup>[53]</sup>;*VDAC3*基因失活的小鼠的肌肉组织研究显示线粒体ETC过程中的复合物减少、线粒体形态异常、肌原纤维间瘤增殖且雄性小鼠出现不育症状。

## 3.4 nDNA编码的线粒体动力基因失活小鼠模型

小鼠体内的线粒体融合基因包括*Mfn1-2*或*Opal*基因都可以通过实验使其发生突变。当所有的突变都是纯和突变时,会导致小鼠胚胎死亡<sup>[49,54]</sup>。通过*Mfn1*<sup>LoxP</sup>与*Mfn2*<sup>LoxP</sup>小鼠杂交可以产生特异性的小脑*Mfn1*或*Mfn2*基因失活的小鼠。小脑中*Mfn1*基因失活的小鼠能够正常成长、发育及繁殖下一代;*Mfn2*基因失活的小鼠在出生后的第1天就有1/3死亡,存活下来的小鼠也出现运动和平衡方面的严重

缺陷<sup>[55]</sup>。出生后的 15~17 d, 小鼠的大小只有对照组的 25%, 同时发现浦肯野细胞量减少、细胞异常及颗粒细胞数量增加。

### 3.5 mtDNA编码突变相关的线粒体疾病小鼠模型

将 mtDNA 突变导入小鼠体内主要有两个难题: 诱导 mtDNA 突变以及将这些突变导入雌鼠体内。这两个难题可以通过培育有 mtRNA 突变的雌鼠, 再进行 mtDNA 突变分离, 形成独立 mtDNA 突变谱系得以解决。但此方法有两个缺陷: (1) 希望保留的突变可能在生殖细胞中被选择性的丢失; (2) 必须大量培育突变小鼠<sup>[56]</sup>。

目前, 有两种基本的方法可成功将外源突变 mtDNA 导入到雌鼠生殖细胞中: (1) 直接将突变细胞胞质融合到小鼠单个胚胎细胞中且将胚胎植入到假孕小鼠输卵管中; (2) 将带有突变线粒体 DNA 的去核细胞质与未分化的母鼠胚胎干细胞 (female mouse embryonic Stem cell, fmES) 融合后, 注射到另一只小鼠的囊泡中, 再将此嵌合体植入到代孕鼠体内<sup>[3]</sup>。

#### 3.5.1 mtDNA重排小鼠模型

小鼠脑细胞突触小体与胞质融合形成重排的 mtDNA 细胞系后再与小鼠单细胞胚胎融合可建立小鼠 mtDNA 携带 4 696 bp 缺失的重排模型<sup>[3]</sup>。此类小鼠肌肉中缺失型 mtDNA 含量一般在 6%~42% 之间。大约 70% 的 mtDNA 缺失小鼠会出现不育症, 少精液症及精子活力不足, 说明小鼠的精子产生需要消耗呼吸过程中产生的大量能量<sup>[57]</sup>。mtDNA 重排小鼠模型虽然已成功建立, 但是其表型和遗传特性与大多数人类 mtDNA 重排患者间还是存在着差异。

#### 3.5.2 mtNZB和mtCAP<sup>R</sup>小鼠模型

分离自 NZB 小鼠脑细胞的突触小体, 通过密度梯度离心去除内含的线粒体细胞碎片, 再将其与 TK<sup>-</sup> 鼠细胞、p0LMEB4 细胞株融合, 形成 LMEB4 杂交细胞, 利用溴脱氧尿苷法在尿苷缺乏的培养基中挑选出来<sup>[58]</sup>。选出的 mtNZB 细胞杂交细胞与胞质来自于 129SvEvGpil 细胞的 CC9.3.1 fmEs 细胞融合后用线粒体毒素——罗丹明 6G (R6G) 去除细胞内的线粒体。CC9.3.1 (mtNZB) 杂交细胞与 C57BL/6J (B6) 小鼠胚胎细胞融合后, 此小鼠有很多嵌合体产生<sup>[4,59]</sup>。

利用 fmEs 细胞技术将 CAP<sup>R</sup>mtDNA 导入小鼠体内。CC9.3.1 fmEs 细胞与经 R6G 处理后的 501-1 小鼠 (线粒体 DNA 16S rRNA 上发生 T2433C 突变) 细胞中分离的胞质融合<sup>[60]</sup>。获得的携带高含量 CAP<sup>R</sup>

mtDNACC9.3.1(mtCAP<sup>R</sup>) fmEs 融合细胞, 然后将其导入囊泡中, 最终获得嵌合型的雌鼠。CAP<sup>R</sup> 嵌合型小鼠经视网膜电流图检测, 发现其对光的敏感度和应激性降低, 视网膜结构错构, 视神经乳头呈放射性生长。一些嵌合体雌鼠可将同质性或异质性 CAP<sup>R</sup>mtDNA 传递给后代。其子代大部分会胎死腹中或在幼儿期死亡。幸存下来的小鼠, 严重型发育迟缓, 伴肌原纤维断裂和损失的进行性肌病、扩张性心肌病、心脏和肌肉线粒体形态异常的症状<sup>[4]</sup>。这些症状都与线粒体 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 上发生 A3243G 突变导致 MELAS 疾病的症状相似<sup>[61]</sup>。

#### 3.5.3 mtDNA COI与 ND6基因突变小鼠模型

同质性 mtDNA COI 基因 T6589C 错义突变已被成功导入雌鼠生殖细胞。将发生此突变的细胞去核后与 R6G 处理后的 fmEs 细胞融合产生同质性突变 fmEs 融合细胞。通过细胞化学检测发现其复合物 IV (COX) 功能缺损。由此产生的雌性嵌合体小鼠, 经繁殖产生同质性子一代 (F1) 突变小鼠。F1 代雌鼠与 B6 小鼠进行 5 次回交后的 N6 小鼠都发生了 COI 基因突变。6 月龄时, N6 小鼠与对照组 B6 小鼠的心细胞染色后发现 COX 活性下降。对突变小鼠的脑细胞、心细胞、肝细胞和骨骼肌细胞中的 COX 进行生化分析, 发现其活性亦下降。血液中的乳酸水平增加, 且发现有轻微发育迟缓症状, 但并没有与人类线粒体疾病相似表型的症状报道<sup>[62]</sup>。

在另一实验研究中, 线粒体 COI 发生 T6589C 错义突变和 ND6 13885insC 移码突变的细胞同时导入雌鼠生殖细胞内。将此突变细胞再与 R6G 处理后的 CC9.3.1 fmEs 细胞融合, 再与 B6 小鼠交配产生的 111 只后代中仅有 1 只南美雌豚鼠含有突变的 mtDNA。突变小鼠 12 月龄时肌肉组织学表现为红纤维破碎和线粒体异常, 超声心动图分析显示, 所有小鼠均发展为严重心肌病。小鼠同时还伴有肌纤维溶解、双核细胞和心肌纤维化, 部分还表现出心肌炎症、间质水肿、血管数量和直径的增加。心肌血管超微结构分析显示线粒体异常包括线粒体过度增殖, 线粒体内部结构密度减少和线粒体嵴消融, 同时肌丝缺失。因此, 说明单纯的 mtDNA COI T6589C 错义突变遗传可以导致线粒体肌病和心肌病, 进而说明 mtDNA 突变是退行性病变的主要病因<sup>[5]</sup>。

## 4 展望

对于人类遗传和生理学, 以及哺乳动物的 mtDNA 遗传方面, 我们有必要去培育更多的携带有各种

mtDNA 的小鼠细胞种系,通过胞质杂交融合<sup>[3-5]</sup>或通过繁殖 Polg<sup>mut</sup>/Polg<sup>mut</sup> 小鼠产生 mtDNA 突变<sup>[56]</sup>。根据线粒体突变小鼠的数据特征可能可预测与之相关的线粒体功能障碍,进一步确定 mtDNA 变异以及可能伴随的不同 nDNA 突变在一些研究的比较透彻的代谢和退行性疾病中的重要作用;进而探究线粒体、mtDNA 以及 nDNA 基因的外显率和表达率在某些易患病体质以及对感染性疾病的抵抗、癌症、畸形以及其他各种表型异常的疾病中扮演的角色。最终将揭示线粒体和 mtDNA 在许多复杂的生理过程中的作用,为消耗大量医疗资源的代谢退行性疾病的治疗提供依据。

### 【参 考 文 献】

- [1] Sherratt EJ, Thomas AW, Alcolado JC. Mitochondrial DNA defects: a widening clinical spectrum of disorders. *Clin Sci*, 1997, 92(3): 225-35
- [2] Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/skeletal muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*, 1997, 16(3): 226-34
- [3] Inoue K, Nakada K, Ogura A, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet*, 2000, 26(2): 176-81
- [4] Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, et al. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14461-6
- [5] Fan W, Waymire KG, Narula N, et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*, 2008, 319(5865): 958-62
- [6] Wallace DC. Mitochondria as chi. *Genetics*, 2008, 179(2): 727-35
- [7] Wallace DC. Why do we have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Ann Rev Biochem*, 2007, 76: 781-821
- [8] Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006, 46: 215-34
- [9] Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact*, 2006, 163(1-2): 38-53
- [10] Levy SE, Chen YS, Graham BH, et al. Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene*, 2000, 254(1-2): 57-66
- [11] Brower JV, Rodic N, Seki T, et al. Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis. *J Biol Chem*, 2007, 282(40): 29658-66
- [12] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(1): 67-71
- [13] Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, et al. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(8): 2245-56
- [14] Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, et al. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynaminlike protein DLP1. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(15): 5409-20
- [15] Gandre-Babbe S, van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(6): 2402-12
- [16] Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 359-407
- [17] Anne B, Dung MH, Umer K, et al. From axonal transport to mitochondrial trafficking: what can we learn from manganese-enhanced MRI studies in mouse models of Alzheimer's disease? *Curr Med Imag Rev*, 2011, 7(1): 16-27
- [18] Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, et al. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol*, 2012, 226(2): 274-86
- [19] Deschepper M, Hoogendoorn B, Brooks S, et al. Proteomic changes in the brains of Huntington's disease mouse models reflect pathology and implicate mitochondrial changes. *Brain Res Bull*, 2011[Epub ahead of print]
- [20] Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-30
- [21] Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, 1988, 55(4): 601-10
- [22] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, et al. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell*, 1990, 61(6): 931-7
- [23] Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, 348(6302): 651-3
- [24] Holt IJ, Harding AE, Petty RK, et al. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, 1990, 46(3): 428-33
- [25] Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg address. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 363-74
- [26] Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 2006, 25(34): 4647-62
- [27] Rodic N, Oka M, Hamazaki T, et al. DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells*, 2005, 23(9): 1314-23
- [28] Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, et al. Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab*, 2008, 7(4): 312-20
- [29] Li K, Li Y, Shelton JM, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 2000, 101(4): 389-99
- [30] King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 1989, 246(4929): 500-3
- [31] Agostino A, Invernizzi F, Tiveron C, et al. Constitutive



- knockout of *Surf1* is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome *c* oxidase deficiency in mice. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(4): 399-413
- [32] Dell'Agnello C, Leo S, Agostino A, et al. Increased longevity and refractoriness to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neurodegeneration in *Surf1* knockout mice. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(4): 431-44
- [33] Diaz F, Thomas CK, Garcia S, et al. Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome *c* oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(18): 2737-48
- [34] Diaz F, Garcia S, Hernandez D, et al. Pathophysiology and fate of hepatocytes in a mouse model of mitochondrial hepatopathies. *Gut*, 2008, 57(2): 232-42
- [35] Fukui H, Diaz F, Garcia S, et al. Cytochrome *c* oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35): 14163-8
- [36] Elchuri S, Oberley TD, Qi W, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 2005, 24(3): 367-80
- [37] Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11282-7
- [38] Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, et al. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol*, 2008, 172(5): 1325-31
- [39] Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 1995, 11(4): 376-81
- [40] Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9782-7
- [41] Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*, 1996, 13(1): 43-7
- [42] Melov S, Coskun P, Patel M, et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(3): 846-51
- [43] Freeman HC, Hugill A, Dear NT, et al. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2153-6
- [44] Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S, et al. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(7): 1187-94
- [45] Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, et al. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(5): 754-66
- [46] Radi R, Bush KM, Freeman BA. The role of cytochrome *c* and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 300(1): 409-15
- [47] Radi R, Sims S, Cassina A, et al. Roles of catalase and cytochrome *c* I hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 1993, 15(6): 653-9
- [48] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004, 427(6973): 461-5
- [49] Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 2003, 301(5632): 513-7
- [50] Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, et al. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(5): 550-5
- [51] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 2005, 434(7033): 658-62
- [52] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 2005, 434(7033): 652-8
- [53] Anflous K, Armstrong DD, Craigen WJ. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 1954-60
- [54] Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, et al. *Opal* deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(11): 1307-18
- [55] Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 2007, 130(3): 548-62
- [56] Stewart JB, Freyer C, Elson JL, et al. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol*, 2008, 6(1): e10
- [57] Nakada K, Sato A, Yoshida K, et al. Mitochondria-related male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15148-53
- [58] Trounce I, Schmiedel J, Yen HC, et al. Cloning of neuronal mtDNA variants in cultured cells by synaptosome fusion with mtDNA-less cells. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(10): 2164-70
- [59] MacGregor GR, Fan WW. Generating animal models of human mitochondrial genetic disease using mouse ES cells [M]// Notarianni E, Evans MJ. Embryonic stem cells: a practical approach. Oxford: Oxford University, 2006: 72-104
- [60] Blanc H, Wright CT, Bibb MJ, et al. Mitochondrial DNA of chloramphenicol-resistant mouse cells contains a single nucleotide change in the region encoding the 39 end of the large ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(6): 3789-93
- [61] Heddi A, Stepien G, Benke PJ, et al. Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 22968-76
- [62] Kasahara A, Ishikawa K, Yamaoka M, et al. Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNA with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(6): 871-81