

论著

文章编号:1000-5404(2014)08-0780-05

PNPase 调控线粒体 microRNA 对线粒体 DNA 的保护作用

李力力, 游 扬, 周 源, 凌贤龙 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] 目的 探讨抑制 PNPase 表达对线粒体 microRNA (MitomiRs) 表达的影响以及对线粒体 DNA 的保护作用。方法 以人肝癌细胞 SK-Hep1、HepG2 和人骨肉瘤细胞 U₂OS 为研究对象, 用带绿色荧光蛋白的 (green fluorescent protein, GFP) PNPase shRNA 慢病毒转染细胞, 采用 Western blot 方法检测 PNPase 表达。分离细胞线粒体、提取线粒体 RNA、microRNA 芯片检测下调 PNPase 前后线粒体 microRNA (MitomiRs) 种类的变化; Q-PCR 检测 mtDNA 损伤频率、ELISA 方法检测线粒体 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)。结果 激光共聚焦显微镜观察显示, SK-Hep1、HepG2 和 U2OS 细胞转染空载体病毒及 PNPase shRNA 慢病毒转染后 12~24 h 可见明显的绿色荧光。当 MOI (转染复数) = 20 时, 3 种细胞的慢病毒转染效率达 80% 以上。连续观察 2 周, 转染效率仍维持在 70%~80%。Western blot 检测结果显示 PNPase shRNA 组细胞 PNPase 蛋白表达低于正常对照组及阴性对照组。microRNA 芯片显示, PNPase shRNA 后目的细胞 MitomiRs 表达谱发生明显变化, miR-30c-2-3p、miR-494、miR-1273g-3p、miR-4443 表达上调, 而 miR-324-3p、miR-574-5p、miR-371b-5p、miR-6068、miR-21-5p 表达下调。Q-PCR 检测显示 PNPase shRNA 组细胞 mtDNA 损伤频率减少。ELISA 结果显示 PNPase shRNA 组线粒体 8-OHdG 含量下降。结论 抑制肿瘤细胞线粒体 PNPase 表达可导致 MitomiRs 表达谱发生变化, 同时, 肿瘤细胞 mtDNA 损伤减少, 提示 MitomiRs 可能参与了 mtDNA 复制的调控。

[关键词] PNPase; 线粒体; MitomiRs; 氧化损伤

[中图分类号] R394.3; R730.23; R735.7

[文献标志码] A

Regulation of mitochondrial microRNAs by PNPase inhibition prevents mitochondrial DNA from damage *in vitro*

Li Lili, You Yang, Zhou Yuan, Ling Xianlong (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] Objective To investigate the regulation of mitochondrial microRNAs (MitomiRs) by polynucleotide phosphorylase (PNPase) inhibition, and the possible protection effects on mitochondrial DNA (mtDNA). Methods Human hepatocellular cell lines SK-Hep1 and Hep G2 and human bone sarcoma cell line U2OS were transfected by PNPase shRNA lentivirus with green fluorescent protein (GFP). PNPase expression was detected by Western blotting. Then the mitochondria were separated, and MitomiRs were extracted. MitomiRs were analyzed by microRNA chips before and after PNPase shRNA treatment. MtDNA damage frequency was assessed by Q-PCR, and mitochondrial 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) was detected by ELISA. Results Visible green fluorescence was found in SK-Hep1, HepG2 and U2OS cells transfected with PNPase shRNA lentivirus in 12 to 24 h later. When the MOI (transfection plural) was 20, the transfection efficiencies of 3 kinds of cells were more than 80%. In the next 2 consecutive weeks, the transfection efficiencies maintained at 70% to 80%. PNPase expression in the cells transfected with PNPase shRNA lentivirus was lower than that in the normal control and negative control cells. MicroRNA chip analysis results showed the obvious changes of MitomiRs profiles in the PNPase shRNA-treated cells. MiR-30c-2-3p, miR-494, miR-1273-g-3p, and miR-4443 were upregulated, while miR-324-3p, miR-574-5p, miR-371-b-5p, miR-6068, and miR-21-5p were downregulated. MtDNA damage frequency was reduced in the cells transfected with PNPase shRNA, and the content of 8-OHdG in the mitochondria of those cells was lowered. Conclusion Inhibition of PNPase

[基金项目] 国家自然科学基金(81101892);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC 2013C290)

[通信作者] 凌贤龙, E-mail: lingxianlong@yeah.net

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140327.1738.011.html>

expression in tumor cell mitochondria results in changes of MitomiRs expression. At the same time, mtDNA damage is reduced, implying that MitomiRs may participate in the regulation of mtDNA replication.

[Key words] PNPase; mitochondria; MitomiRs; oxidative damage; DNA; microRNA

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101892) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013C290). Corresponding author: Ling Xianlong, E-mail: lingxianlong@yeah.net

线粒体是真核细胞内一种多功能细胞器,参与细胞内诸多功能的实现,如能量代谢、离子平衡、脂质、氨基酸和核酸的合成、细胞运动、增殖以及凋亡等。研究表明,线粒体是一个动态的架构,它通过持续地分裂与融合以维持其完整性^[1]。线粒体含有自身的DNA (mitochondrial DNA, mtDNA),编码22 tRNAs、2 rRNAs和13多肽基因。mtDNA缺失与突变以及ROS产生过多参与细胞老化^[2-3];线粒体基因表达下降以及线粒体结构破坏与人体发育异常有关^[4];线粒体电子传递链的缺陷参与了糖尿病的发生^[5]。

哺乳动物细胞的多核苷酸磷酸化酶 (polynucleotide phosphorylase, PNPase) 是一种3'→5核糖核酸外切酶及多聚腺苷酸聚合酶,位于线粒体膜间隙,调控核编码小RNA,如RNase P、5S rRNA,和MRP RNAs进入线粒体基质^[6],且PNPase在线粒体内microRNA (MitomiRs)的降解过程中起作用^[7]。

线粒体microRNA (MitomiRs)可能参与了线粒体DNA复制、转录过程的调控。本研究通过抑制肿瘤细胞PNPase的表达调控MitomiRs,观察线粒体DNA损伤状况变化。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞SK-Hep1、HepG2以及骨肉瘤细胞U2OS均购自中国科学院细胞库。RPMI1640 (Hyclone, USA)、DMEM高糖培养基 (Hyclone, USA); FBS (Gibco, USA); PBS (博士德生物工程公司, 中国武汉); 胰酶溶液 (TBD, USA); q-PCR逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒 (TaKaRa, USA); 线粒体蛋白抽提试剂盒 (凯基生物公司, 中国南京); BCA蛋白定量试剂盒 (康为世纪生物科技公司, 中国北京); 线粒体分离试剂盒 (普利莱基因技术公司, 中国北京); ELISA试剂盒 (信裕生物公司, 中国上海); PNPase单克隆抗体 (epitomics, USA); 线粒体microRNA芯片 (Agilent, USA); DMSO分析试剂 (Amersco, USA)。

1.2 细胞培养与转染

HepG2、SK-Hep1、U2OS三种细胞在含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的RPMI1640培养基中培养, 孵箱环境设定为37℃, 5% CO₂。0.25%胰酶消化后传代培养。

PNPase ShRNA慢病毒和空载体病毒由Invitrogen公司构建。PNPase干扰片段序列为: 5'-GCTTTGAAGCATCCGACTG-TA-3'; 阴性对照片段序列为: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。取出4℃保存的病毒, 使用台式离心机离心20 s (使病毒完全

悬于离心管底部即可), 通过文献查找, 本实验采用MOI值(细胞感染复数 MOI = 慢病毒滴度 × 慢病毒使用量 / 细胞数目) 为20来计算感染孔的慢病毒使用量。根据MOI值, 将准确计算好的慢病毒稀释到培养基中(尽可能保证所获得的含有慢病毒的培养基的总体积为最小体积, 以获得最佳的感染效率)。待需感染病毒细胞状态好, 且贴壁率为80%时, 用移液器吸取计算好的准确体积的病毒液加入准备好的培养基, 混匀后放于CO₂培养箱(37℃, 5% CO₂)孵育过夜。24 h后将含有慢病毒的培养液更换成正常培养液; 感染病毒48~96 h后, 用激光共聚焦显微镜观察荧光效果。

1.3 细胞线粒体蛋白提取

收集SK-Hep1、HepG2和U2OS细胞、转染空载体病毒和PNPase ShRNA慢病毒的细胞, 按照线粒体蛋白提取试剂盒说明书进行。蛋白定量采用BCA蛋白定量试剂盒测定。

PNPase干扰效果测定: 配制8% SDS-PAGE凝胶, 每组蛋白上样量为80 μg, 电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h后, 分别加入抗PNPase一抗(1:1000)和抗β-actin一抗(1:500)后4℃孵育过夜。洗膜后加入二抗(1:2000)室温孵育1 h, 洗膜后加入ECL发光液置于凝胶成像系统(Bio-Rad)中显影。GAPDH作为内参蛋白用于比较目的蛋白表达量。

1.4 microRNA芯片检测MitomiRs

收集SK-HEP1、HepG2、U2OS细胞以及SK-Hep1-ShPNPase、HepG2-ShPNPase及U2OS-ShPNPase细胞, 按照线粒体分离试剂盒说明书分离细胞线粒体; 采用mirVana™ miRNA Isolation Kit (Agilent) 提供方法, 提取线粒体RNA。所得线粒体RNA经Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)电泳质检合格后, 与Agilent miRNA芯片进行芯片杂交; 采用Agilent Feature Extraction (FE) software version 9.5.3软件进行芯片数据提取、GeneSpring GX软件分析比较MitomiRs变化。

1.5 q-PCR检测线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 损伤

文献[8]报道, 在94℃、2 min的条件下, 完整的mtDNA不能解链, 而损伤的mtDNA则被解链并扩增; 在94℃、6 min的条件下, 所有的mtDNA(包括完整的和损伤的)均解链并扩增。因此, 可通过检测mtDNA扩增频率间接反映mtDNA损伤状况。

参照Passos等^[9]和Santos等^[10]报道的方法, 先提取培养细胞DNA, 再参照q-PCR试剂盒的说明完成检测过程。用于扩增mtDNA D-loop HV1序列的引物: 上游引物: 5'-GATTTGGGTACCACCCAAGTATTG-3' (16042~16064); 下游引物: 5'-AATATTTCATGGTGGCTGGCATGTA-3' (16125~16102); 内参引物: h actin f 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'; h actin r 5'-CTGGAAGCTGGACAGCGAGG-3'。q-PCR反应条件设置: 第1次

PCR 扩增,94 °C 解链 2 min 后,94 °C 30 s→60 °C 45 s→72 °C 45 s,共 32 个循环,得到第 1 个 Ct 值(Ct1);第 2 次 PCR 扩增,94 °C 解链 6 min 后,94 °C 30 s→60 °C 45 s→72 °C 45 s,共 32 个循环,得到第 2 个 Ct 值(Ct2);Ct1/Ct2 的比值即为 mtDNA 的扩增频率。

1.6 ELISA 定量测定细胞线粒体 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) 含量

文献[11-12]报道,8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)是 DNA 氧化损伤的特异产物,羟基自由基与 DNA 发生反应引起鸟嘌呤在 C-8 位的羟基化,形成碱基修饰产物 8-OHdG,因此,8-OHdG 是内源性和外源性因素对 DNA 氧化损伤产生的生物学标志。采用线粒体分离试剂盒分离细胞线粒体。ELISA 方法定量测定线粒体 8-OHdG。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μL,余孔分别加标准品或待测样品 100 μL,轻轻晃动混匀,37 °C 反应 120 min,甩干弃去液体;每孔加检测溶液 A 工作液 100 μL,37 °C 反应 60 min,甩干弃去孔内液体;每孔加检测溶液 B 工作液 100 μL,酶标板上覆膜 37 °C 温育 60 min 后,甩干弃去孔内液体。依序每孔加底物溶液 90 μL,酶标板上覆膜 37 °C 避光显色。依序每孔加终止溶液 50 μL 终止反应。酶联仪依序测量各孔光密度值[D(450)],检测波长 450 nm。

2 结果

2.1 目的细胞 PNPase shRNA 慢病毒转染

SK-Hep1、HepG2 和 U2OS 细胞空载体病毒及 PNPase shRNA 慢病毒转染后 12~24 h 开始可见明显的绿色荧光。当 MOI(转染复数)=20 时,3 种细胞的慢病毒转染效率(GFP 阳性率)在 24 h 达 80% 以上。此后 2 周内连续观察,荧光细胞数没有下降,转染效率仍维持在 70%~80% (图 1)。

2.2 肿瘤细胞 PNPase RNA 干扰后线粒体 PNPase 表达

SK-Hep1、HepG2 和 U2OS 细胞 PNPase RNA 干扰后线粒体 PNPase 表达明显下调,而转染空载体病毒的细胞粒体 PNPase 表达无明显变化(图 2)。

2.3 microRNA 芯片检测 PNPase 表达前后细胞 MitomiRs 的变化

GeneSpring GX 软件分析 microRNA 芯片结果显示,PNPase RNA 干扰后目的细胞 MitomiRs 表达发生明显变化,miR-30c-2-3p、miR-494、miR-1273g-3p、miR-4443 表达上调,而 miR-324-3p、miR-574-5p、miR-371b-5p、miR-6068、miR-21-5p 5 种 MitomiRs

表达量明显下调(图 3)。

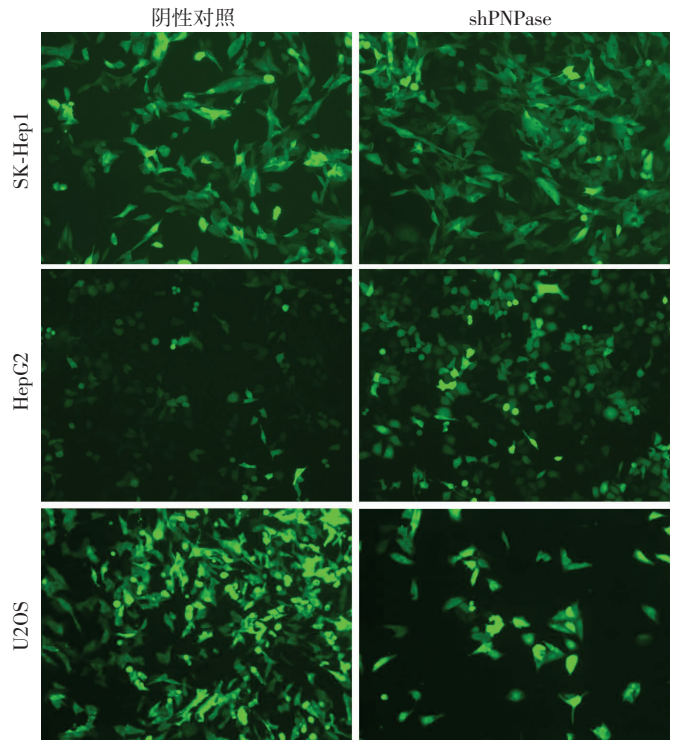


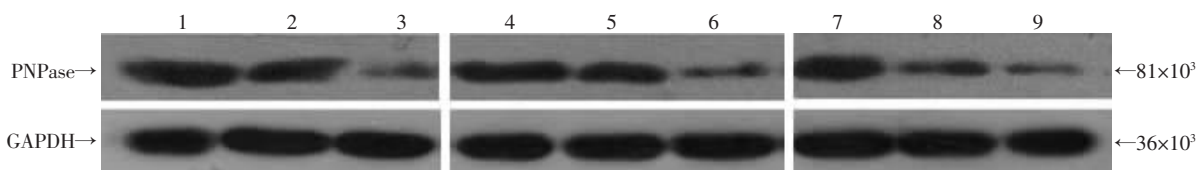
图 1 目的细胞慢病毒转染激光共聚焦观察 (×100)

2.4 目的细胞线粒体 PNPase 表达与 mtDNA 损伤

q-PCR 检测结果,SK-Hep 1 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组、HepG2 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组、空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组 8-OHdG 含量分别为:0.104、0.090、0.017、0.093、0.089、0.023、0.070、0.082、0.020,提示抑制 PNPase 表达后,mtDNA 损伤频率明显降低。

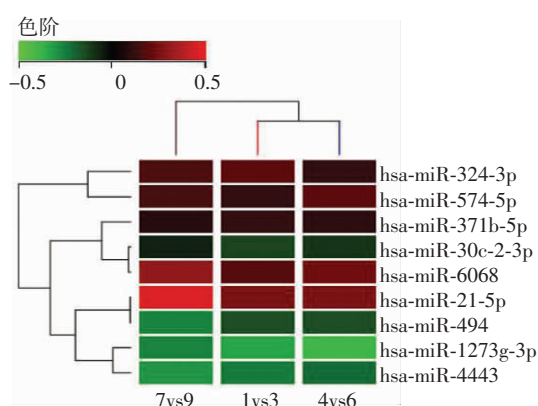
2.5 目的细胞线粒体 PNPase 表达的减少能降低细胞的氧化损伤

ELISA 方法检测细胞线粒体 8-OHdG 的结果显示:SK-Hep 1 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组、HepG2 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组、空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组 8-OHdG 含量分别为 225.41、218.93、78.34、262.99、253.32、85.39、266.85、238.52、90.71 SK-Hep1-ShPNPase、HepG2-ShPNPase 以及 U2OS-ShPNPase 细胞线粒体内 8-OHdG 含量明显减低,较之于亲本细胞和转染阴性对照的细胞有显著差异(P<0.01),提示线粒体 DNA 氧化损伤减少。



1、2、3: 分别代表 SK-Hep 1 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组;4、5、6: 分别代表 Hep G2 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组;7、8、9: 分别代表 U2OS 空白对照组、阴性对照组、ShPNPase 组

图 2 Western blot 检测线粒体 PNPase 蛋白表达



7vs9: U2OS 空白对照组 vs U2OS-ShPNPase 组; 1vs3: SK-Hep 1 空白对照组 vs SK-Hep 1-ShPNPase 组; 4vs6: HepG2 空白对照组 vs HepG2-ShPNPase 组

图3 microRNA 芯片检测 MitomiRs 表达变化

3 讨论

PNPase 存在于细胞线粒体膜间隙, 调控某些非编码小 RNA (miRNAs) 进入线粒体, 参与线粒体基因表达调控^[6,13]。本研究采用 siRNA 技术抑制 SK-Hep 1、HepG2 和 U2OS 细胞的 PNPase 表达, microRNA 芯片检测发现线粒体中 microRNA 的表达谱产生了变化, 其中 miR-30c-2-3p、miR-494、miR-1273g-3p、miR-4443 表达上调, 而 miR-324-3p、miR-574-5p、miR-371b-5p、miR-6068、miR-21-5p 表达下降。与胞质 mRNAs 类似, 线粒体 RNA (mtRNA) 利用长 poly(A) 尾修复 poly(A) 结合蛋白, 以此来维持细胞平衡^[14]。人线粒体特定 poly(A) 聚合酶可合成 mtRNA poly(A) 尾端。用 siRNA 技术敲除 poly(A) 聚合酶基因会引起线粒体 mRNA poly(A) 长度减少及其稳定程度^[15]。相反, 若抑制 PNPase 表达, 则会导致 mtRNA poly(A) 尾长度明显增加, 但不会影响这些 mRNA 的稳定性^[14-15]。文献^[16]报道, 可能是一种 Var1 3-PNPase 复合物抑制物通过移除缩短的 RNAs 来调节 PNPase 介导的线粒体非编码 RNA 降解。

miRNAs 是一大类小分子非编码 RNA, 由细胞核基因编码, 长约 22 nt; 可结合于 mRNAs 的 3'-UTR 区域抑制 mRNA 翻译及促进 mRNA 降解, 其调控作用多在转录后水平^[17]。有研究提示, miRNAs 也能靶向作用目的 mRNA 的 5'-UTR 区域及开发阅读框 (open reading frames, ORF)^[17], 调控作用目的基因。

而线粒体中 microRNAs (MitomiRs) 可能参与了 mtDNA 转录、复制的调控, 线粒体 PNPase 的表达减少即会引起 MitomiRs 表达谱的改变^[13]。本研究结果表明, 抑制肿瘤细胞 PNPase 表达后, mtDNA 损伤频率明显减少, 提示可能与 MitomiRs 表达谱改变有关, 但具

体参与调控 mtDNA 转录及复制的 MitomiRs 的种类及机制有待进一步研究。某些种类的 miRNAs 在线粒体中表达丰富^[18-21]。MitomiRs 在细胞中的表达种类与其类型有关, 如, 人肌管细胞线粒体中存在的 miRNAs 有: miR-103、miR-23a 及 miR-423-3p 等; 而 HeLa 细胞线粒体中 miR-513a-5p、miR-328-5p 及 miR-1908 等种类大量表达。一旦 MitomiRs 的表达产生异常就可能

导致线粒体功能障碍^[22]。mtDNA 是细胞氧化损伤的敏感靶标^[23]。mtDNA 分子为双链闭合环状 DNA 分子, 线粒体 DNA (mtDNA) 分子是双链闭合环状结构, 编码 37 个基因, 其中有 13 个是 ETC 的亚基单位, 2 个编码 rRNAs, 22 个编码转运 rna^[24]。mtDNA 容易受到错误复制导致的突变、DNA 损伤、ROS 和基本的 DNA 修复机制的影响^[25]。mtDNA 作为编码 ETC 亚基的关键分子, mtDNA 突变常常导致 oxphos 的缺陷以及 ROS 增加生产^[26], 因此也成为线粒体压力信号。mtDNA 修复酶在应对不同的压力、增加这些酶的活性及防止氧化应激诱导细胞凋亡等方面发挥重要作用^[27], 诱导 IR 和 ROS 生产^[28], 以及心脏的纤维化^[29]。相反, 减少线粒体 DNA 修复已被证明可加强神经退化^[30] 和年龄相关性黄斑变性^[31], 这些表面了细胞对 mtDNA 损伤的下调性适应在疾病过程中具有潜在的重要性。

8-OHdG 是衡量 DNA 内源性氧化损伤效应的关键性标志物^[32]。活性氧 (ROS) 容易攻击 DNA 的鸟嘌呤碱基, 形成 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), 它可结合到胸苷胞嘧啶, 8-OHdG 通常被认为是一个突变导致的氧化应激水平的生物标志物。研究表明, 外源性 8-OHdG 可以相应地减少 ROS 产生、减弱细胞核 factor- κ B 的信号通路, 以及改善促炎症介质的表达, 如白介素等; 也可能诱导各种炎症性胃肠道疾病, 包括胃炎、肠炎、胰腺炎, 甚至以结肠炎为基础的肿瘤^[33]。

本研究显示, 在 SK-Hep1、HepG2 及 U2OS 细胞中, 抑制 PNPase 蛋白表达后, ELISA 检测显示细胞内氧化损伤产物 8-OHdG 减少; 相应地, 同样处理的细胞株中, Q-PCR 结果显示 mtDNA 相对表达量降低, 表明其损伤频率下降, 与 8-OHdG 检测结果一致, 说明下调 PNPase 的表达是会减少细胞的氧化损伤程度的; 而 PNPase 的作用目前较为肯定的是, 通过介导 microRNA 进入线粒体来影响线粒体的氧化损伤。因此 PNPase 可能通过调控某些特定 MitomiRs 的表达, 如已通过 microRNA 芯片筛选出的表达下调的 miR-324-3p、miR-574-5p、miR-371b-5p、miR-6068、miR-21-5p 等, 对线粒体功能及细胞代谢产生影响。对于筛选出的 MitomiRs 所作用的靶基因、相关通路的预测及其作用机制还有待下一步研究。

参考文献:

- [1] Detmer S A, Chan D C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 870–879.
- [2] Kujoth G C, Hiona A, Pugh T D, *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging[J]. *Science*, 2005, 309(5733): 481–484.
- [3] Lemieux H, Vazquez E J, Fujioka H, *et al.* Decrease in mitochondrial function in rat cardiac permeabilized fibers correlates with the aging phenotype[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(11): 1157–1164.
- [4] Au H K, Yeh T S, Kao S H, *et al.* Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1042: 177–185.
- [5] Ritov V B, Menshikova E V, Azuma K, *et al.* Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(1): E49–E58.
- [6] Wang G, Chen H W, Oktay Y, *et al.* PNPase regulates RNA import into mitochondria[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 456–467.
- [7] Andrade J M, Pobre V, Arraiano C M. Small RNA modules confer different stabilities and interact differently with multiple targets[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52866.
- [8] Chen J, Kadlubar F F, Chen J Z. DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(4): 1377–1388.
- [9] Passos J F, Saretzki G, Ahmed S, *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence[J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(5): e110.
- [10] Santos J H, Meyer J N, Mandavilli B S, *et al.* Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 314: 183–199.
- [11] Wiseman A, Attardi G. Reversible tenfold reduction in mitochondrial DNA content of human cells treated with ethidium bromide[J]. *Mol Gen Genet*, 1978, 167(1): 51–63.
- [12] Floyd R A, Watson J J, Harris J, *et al.* Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 137(2): 841–846.
- [13] Das S K, Bhutia S K, Sokhi U K, *et al.* Human polynucleotide phosphorylase (hPNPase(oid-35)): an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of RNA degradation functions[J]. *Oncogene*, 2011, 30(15): 1733–1743.
- [14] Temperley R J, Seneca S H, Tonska K, *et al.* Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(18): 2341–2348.
- [15] Nagaike T, Suzuki T, Katoh T, *et al.* Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19721–19727.
- [16] Wang D D, Shu Z, Lieser S A, *et al.* Human mitochondrial SUV3 and polynucleotide phosphorylase form a 330-kDa heteropentamer to cooperatively degrade double-stranded RNA with a 3'-to-5' directionality[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20812–20821.
- [17] Moretti F, Thermann R, Hentze M W. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame[J]. *RNA*, 2010, 16(12): 2493–2502.
- [18] Kren B T, Wong P Y, Sarver A, *et al.* MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis[J]. *RNA Biol*, 2009, 6(1): 65–72.
- [19] Bian Z, Li L M, Tang R, *et al.* Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions[J]. *Cell Res*, 2010, 20(9): 1076–1078.
- [20] Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, *et al.* Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20220.
- [21] Bandiera S, Ruberg S, Girard M, *et al.* Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20746.
- [22] Li N, Bates D J, An J, *et al.* Up-regulation of key microRNAs, and inverse down-regulation of their predicted oxidative phosphorylation target genes, during aging in mouse brain [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(5): 944–955.
- [23] Sedensky M M, Morgan P G. Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants [J]. *Exp Gerontol*, 2006, 41(3): 237–245.
- [24] Taylor R W, Turnbull D M. Mitochondrial DNA mutations in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 389–402.
- [25] Wallace D C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(5): 440–450.
- [26] Indo H P, Davidson M, Yen H C, *et al.* Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage[J]. *Mitochondrion*, 2007, 7(1/2): 106–118.
- [27] Cheng Y, Ren X, Gowda A S, *et al.* Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e731.
- [28] Yuzefovych L V, Solodushko V A, Wilson G L, *et al.* Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(1): 92–100.
- [29] Wang J, Wang Q, Watson L J, *et al.* Cardiac overexpression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 protects mitochondrial DNA and reduces cardiac fibrosis following transaortic constriction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): H2073–H2080.
- [30] Jeppesen D K, Bohr V A, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 94(2): 166–200.
- [31] Zhang Y, Zhang L, Zhang L, *et al.* Expression changes in DNA repair enzymes and mitochondrial DNA damage in aging rat lens[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1754–1763.
- [32] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, 27(2): 120–139.
- [33] Ock C Y, Kim E H, Choi D J, *et al.* 8-Hydroxydeoxyguanosine; not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(4): 302–308.

(收稿:2014-03-12;修回:2014-03-21)

(编辑 王红)