

TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节及对线粒体形态功能的影响

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌

■背景资料

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是病毒性肝炎、酒精性及非酒精性脂肪肝病、缺血再灌注损伤等损伤性病变时肝细胞损伤的主要细胞因子。研究发现TNF- α 能引起细胞线粒体损伤, 抑制线粒体的呼吸功能并增加线粒体活性氧(ROS)和过氧化脂质的形成, 但具体分子机制并不十分清楚。

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 张勇与江隆昌对此文所作贡献均等; 此课题由张勇与郑启昌设计; 研究过程由张勇、江隆昌、胡文君及胡青钢操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑启昌提供; 数据分析由胡文君完成; 本论文写作由张勇与江隆昌完成。

通讯作者: 郑启昌, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科. zqc654@21cn.com

收稿日期: 2010-07-30 修回日期: 2010-09-07

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-18

TNF- α treatment alters Mfn2 expression and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells

Yong Zhang, Long-Chang Jiang, Wen-Jun Hu, Qing-Gang Hu, Qi-Chang Zheng

Yong Zhang, Long-Chang Jiang, Wen-Jun Hu, Qing-Gang Hu, Qi-Chang Zheng, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Qi-Chang Zheng, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zqc654@21cn.com

Received: 2010-07-30 Revised: 2010-09-07

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of treatment with tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the expression of mitofusin 2 (Mfn2) and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells.

METHODS: After pEGFP-Mfn2 plasmid was transfected into LO2 cells with Lipofectamine 2000, transfected LO2 cells were incubated with TNF- α for 12 h. The expression of Mfn2 mRNA and protein was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes were used to detect the changes in mitochondrial morphology. ATP synthesis and reactive oxygen species (ROS) pro-

duction were measured to assess mitochondrial function.

RESULTS: RT-PCR and Western blot analyses showed that Mfn2 was highly expressed in LO2 cells. After treatment of LO2 cells with TNF- α , Mfn2 expression was significantly suppressed (0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 ; 0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $P < 0.05$), ATP level decreased ($2.00 \mu\text{mol/g} \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$ vs $5.81 \mu\text{mol/g} \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), ROS production increased (80.68 ± 4.02 vs 65.44 ± 3.47 , $P < 0.05$), and the normal tubular network of mitochondria was fragmented into short rods or spheres when compared to control cells. In contrast, these changes were not significant in Mfn2-transfected LO2 cells.

CONCLUSION: TNF- α treatment may alter mitochondrial morphology and impair mitochondrial function by decreasing the expression of Mfn2 in hepatic LO2 cells.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Mitofusin 2; Adenosine triphosphate; Reactive oxygen species

Zhang Y, Jiang LC, Hu WJ, Hu QG, Zheng QC. TNF- α treatment alters Mfn2 expression and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3452-3456

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 对肝细胞株LO2细胞线粒体融合蛋白基因2 (Mfn2) 基因表达的调节作用以及对线粒体形态和细胞三磷酸腺苷(ATP)、活性氧(ROS)生成的影响。

方法: 利用脂质体Lipofectamine 2000将Mfn2基因荧光表达载体(pEGFP-Mfn2)转染肝细胞株LO2细胞, 以终浓度为500 kU/L的TNF- α 作用LO2细胞株和稳定高表达Mfn2的LO2细胞株12 h, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot检测各组细胞Mfn2 mRNA转录水平以及蛋白的表达水平, 线粒体绿色荧光探针(Mito-Tracker Green)染色观察线粒体形态变

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

化, 荧光素酶ADP/ATP发光法检测各组细胞ATP含量, 荧光探针DCFH-DA测定细胞ROS生成水平.

结果: 经TNF- α 处理后LO2细胞中Mfn2基因的mRNA及蛋白表达水平显著低于空白对照组(0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 ; 0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $P < 0.05$); 对照组及转染Mfn2基因组肝细胞线粒体形态主要为丝状网络或长柱状, TNF- α 处理后未转染肝细胞线粒体断裂成点状碎片, 但转染组线粒体形态则无明显改变; TNF- α 处理后LO2细胞内ATP浓度显著下降($2.00 \mu\text{mol/g} \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$ vs $5.81 \mu\text{mol/g} \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), 而ROS生成水平较空白对照组显著升高(FI: 80.68 ± 4.02 vs 65.44 ± 3.47 , $P < 0.05$), 但转染组细胞内ATP下降水平要显著低于未转染组, 而未转染组ROS升高程度则显著高于转染组($P < 0.05$).

结论: TNF- α 通过抑制肝细胞Mfn2的表达诱导线粒体形态改变及线粒体功能障碍.

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 线粒体融合蛋白基因2; 三磷酸腺苷; 活性氧

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌. TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节及对线粒体形态功能的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3452-3456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3452.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)是病毒性肝炎^[1]、酒精性及非酒精性脂肪肝病^[2,3]、缺血再灌注损伤^[4]等损伤性病变时肝细胞损伤的主要细胞因子. 研究发现TNF- α 能引起细胞线粒体损伤, 抑制线粒体的呼吸功能并增加线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)和过氧化脂质的形成^[5,6], 但具体分子机制并不十分清楚. 线粒体融合蛋白基因2(mitofusin-2 gene, Mfn2)能促进线粒体的融合, 与线粒体形态、结构和功能有着密切联系^[7]. TNF- α 是否影响Mfn2基因的表达尚未见报道, 我们通过体外实验, 探讨TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节作用以及对线粒体形态和功能的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 绿色荧光蛋白-Mfn2基因表达载体(pEGFP-Mfn2)由本实验室构建并保存, 肝细胞株LO2细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; TRIzol RNA抽提试剂、RT-PCR试

剂盒、RPMI 1640培养基、新生牛血清等购自美国Gibco公司; TNF- α 购自Invitrogen公司; Western blot化学发光试剂、硝酸纤维素膜、Mfn2单克隆抗体购自美国Sigma公司; BCA蛋白定量试剂、荧光素酶ADP/ATP发光检测试剂盒、7'-二氯荧光黄双乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针、ROS测定试剂盒购自美国Biomiga公司; 活体组织ROS初级荧光测定试剂盒购自GENMED公司; Mfn2引物由上海生物工程公司合成: 5'-ATGCATCCCCACTTAAGCAC-3', 5'-CCAGAGGGCAGAACTTTGTC-3', 内参GAPDH由ToYoBo公司试剂盒提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及pEGFP-Mfn2转染: 将人肝癌细胞株LO2细胞转入含100 mL/L血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中培养, 3 d传代1次. 取 5×10^5 个细胞/孔接种6孔培养板, 在培养箱中过夜培养至铺满孔底面积80%以上, 采用脂质体介导方法转染pEGFP-Mfn2, 转染方法参照说明书. 每孔加入3 μL 脂质体包裹的siRNA(终浓度为10 nmol/L), 每孔最终体积是1 mL. 40 h后更换含血清培养基进行分析.

1.2.2 TNF- α 处理细胞: 将细胞分为TNF- α 组、TNF- α +Mfn2转染组、Mfn2转染组和空白对照组, 每组细胞取 5×10^5 个细胞/孔接种6孔培养板, 在培养箱中过夜培养至铺满孔底面积80%以上, 前两组分别加入含TNF- α (400 kU/L)的新鲜培养液作用12 h, 然后收集细胞检测, 每组均设4个重复.

1.2.3 Mfn2基因RT-PCR分析: 将约 1×10^6 细胞用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 使用紫外分光光度计调整RNA浓度为1 g/L. 在9 μL 无RNA酶水中加入1 μg RNA, Oligo(dT)20 1 μL , 温度65 $^{\circ}\text{C}$, 10 min后立即置于冰上. 加入5 \times RT Buffer 4 μL , dNTP mixture(各10 mmol/L)2 μL , RNase inhibitor(10 U/ μL)1 μL , ReverTra Ace 1 μL . 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min. 瞬间离心后置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 在25 μL PCR体系中加入Cdc42上下游引物各1 μL , Taq DNA聚合酶1 μL , 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ (GAPDH为55 $^{\circ}\text{C}$)30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s共35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min. PCR产物25 μL 琼脂糖凝胶电泳, 50 V, 30-45 min后照相.

1.2.4 各组细胞Mfn2 Western blot定量分析: 将约 1×10^6 细胞加60 μL 去污剂裂解液进行匀浆. 置于冰上30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min, 取

■ 研发前沿

线粒体是细胞内高度动态变化的细胞器, 其在细胞内不断运动、融合、分裂并形成动态平衡的网状结构. 线粒体形态对于细胞维持正常生理代谢和机体发育起着重要的作用, 一旦调控出现障碍会导致严重的疾病, 因此防止或修复线粒体损伤是目前的研究热点.

■相关报道

Chen等发现Mfn2表达缺失时细胞呼吸率下降,进一步检测发现呼吸链中复合体I、III、IV的电子转移率下降。

上清液即为总蛋白抽提物。BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白样品(每泳道60 μg)及蛋白分子量标准进行120 g/L SDS-PAGE电泳,再将蛋白质点转移到纤维素(NC)膜上,置于含50 g/L脱脂奶粉的TBST(50 mmol/L Tris-HCL, pH7.6; 150 mmol/L NaCl; 0.1% Tween20)中4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;加入以TBST稀释的抗Mfn2单克隆抗体(1:200, V/V, 兔抗鼠)和抗GAPDH抗体(1:500, V/V, 兔抗鼠)后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2000, V/V, 羊抗兔IgG), 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床下杂交1 h, 洗膜后用ECL试剂盒检测, X光胶片曝光、照相。图像运用Quantitative one软件进行分析。

1.2.5 线粒体绿色荧光探针染色观察线粒体形态变化: 收集各组细胞用PBS洗涤细胞2次, PBS配制的3.7%甲醛溶液室温固定细胞10 min。含0.1% Triton X-100的PBS洗涤2-4次, 每次约5 min, 免疫荧光染色二抗稀释液(P0108)按照1:200的比例稀释绿色荧光探针(Mito-Tracker Green), 把Mito-Tracker Green染色工作液按照每个片子约200 μL 的比例滴加到片子上, 室温避光孵育20-60 min。用免疫染色洗涤液洗2-4次, 每次约5 min, 后用荧光显微镜进行观察。

1.2.6 LO2细胞荧光素酶ADP/ATP发光检测: 取 1×10^6 细胞, 加入1 mL裂解液后匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min, 保留上清。冰浴上溶解待用试剂, ATP标准溶液稀释成0.001、0.01、0.1、10和1 $\mu\text{mol/L}$ 5个浓度。按照1:100的比例用ATP检测试剂稀释液稀释ATP检测试剂。在检测孔或检测管内加上10 μL 样品或标准品, 迅速混匀, 间隔6 s后立即用液闪仪测定相对光单位(relative light unit, RLU)值。根据标准曲线计算出样品中ATP的浓度, 每组均设4个重复。各组组织蛋白定量, 把ATP的浓度换算成 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白的形式。

1.2.7 LO2细胞荧光探针DCFH-DA测定ROS: 使用活体组织ROS初级荧光测定试剂盒, 试剂B置于冰槽融化, 试剂C 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴预热。取10 μL 试剂B及990 μL 试剂C于1.5 mL离心管中, 置入暗室。取 1×10^6 细胞消化离心后加入5 mL预冷的试剂C置入15 mL锥形离心管, 震荡5 s。移取5 μL 细胞裂解液进行蛋白定量检测。移取50 μL 细胞裂解液或50 μL 试剂C(背景对照)到1 mL石英比色杯中, 加入950 μL GENMED染色工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴20 min, 避免光照。荧光分光光度计检测: 激发波长490 nm, 散发波长520 nm。样品RFU-对照RFU = 实际RFU, 其增加表明ROS含量升高, 每组均设4个重复。

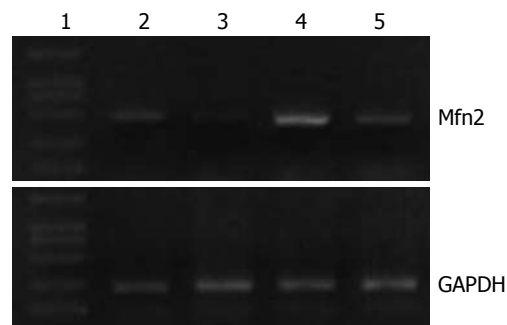


图1 各组细胞Mfn2 mRNA转录水平。1: DNA Marker; 2: 空白对照组; 3: TNF- α 组; 4: pEGFP-Mfn2转染组; 5: TNF- α +pEGFP-Mfn2转染组。

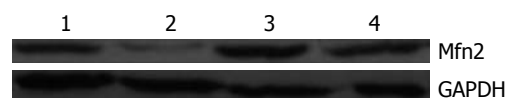


图2 Mfn2蛋白的表达。1: 空白对照组; 2: TNF- α 组; 3: pEGFP-Mfn2转染组; 4: TNF- α +pEGFP-Mfn2转染组。

统计学处理 全部资料用SPSS10.0软件进行统计分析, 计量资料用mean \pm SD表示, 各组及组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 各组细胞Mfn2 mRNA的表达 TNF- α 处理LO2细胞后Mfn2基因条带灰度值显著低于空白对照组细胞条带灰度值, 两组转录水平有显著差异(0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 , $n = 4$, $P < 0.05$), pEGFP-Mfn2转染组细胞中条带灰度值显著高于空白对照组(1.209 ± 0.021 vs 0.742 ± 0.018 , $n = 4$, $P < 0.05$), TNF- α 处理转染组细胞后, Mfn2表达较处理前下降(0.911 ± 0.020), 但仍高于其他各组($n = 4$, 均 $P < 0.05$, 图1)。

2.2 各组细胞Mfn2蛋白的表达 转染pEGFP-Mfn2质粒后Mfn2蛋白的表达水平显著增高(0.813 ± 0.027 vs 0.580 ± 0.011 , $n = 4$, $P < 0.05$), 经TNF- α 处理LO2细胞后Mfn2蛋白表达显著下降(0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $n = 4$, $P < 0.05$), 而转染组细胞蛋白表达较空白对照组无明显差异($n = 4$, $P > 0.05$, 图2)。

2.3 各组细胞线粒体绿色荧光染色 荧光显微镜观察发现空白对照组细胞线粒体成长柱状或网状, TNF- α 处理细胞后线粒体破坏成短棒状或者点状, pEGFP-Mfn2质粒后线粒体主要为网状, 转染组细胞经TNF- α 处理后线粒体改变并不显著(图3)。

2.4 荧光素酶ADP/ATP发光检测及荧光探针DCFH-DA ROS测定 ATP标准荧光发光曲线以

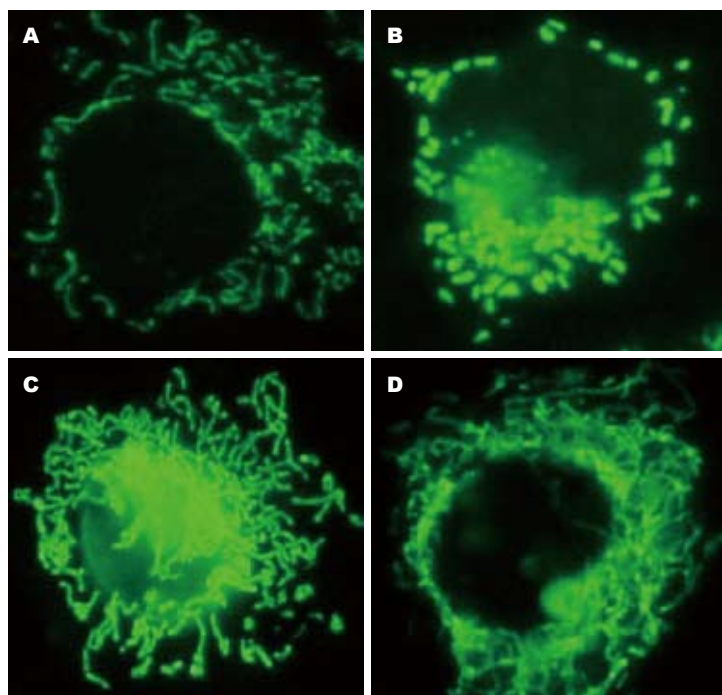


图3 LO2细胞线粒体荧光染色. A: 空白对照组; B: TNF- α 组; C: pEGFP-Mfn2转染组; D: TNF- α +pEGFP-Mfn2转染组.

应用要点

本研究发现TNF- α 能显著下调肝细胞Mfn2的表达, 导致线粒体融合障碍及功能损伤, 而高表达Mfn2能抑制TNF- α 对肝细胞线粒体的破坏作用, 为治疗TNF- α 所致的肝脏损伤性疾病提供了新的药物治疗靶点.

表1 各组细胞ATP含量及ROS相对吸光度值 (mean \pm SD, $n = 20$)

分组	ATP(μ mol/g)	ROS(FI)
空白对照组	5.81 \pm 0.31	65.44 \pm 3.47
TNF- α +Mfn2转染组	5.70 \pm 0.22 ^c	63.31 \pm 3.03 ^c
TNF- α 组	2.00 \pm 0.15 ^a	80.68 \pm 4.02 ^a
Mfn2转染组	7.01 \pm 0.27 ^a	50.20 \pm 3.69 ^a

^a $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.01$ vs TNF- α 组.

6 s发光强度积分值的对数为纵坐标, ATP浓度的对数为横坐标, 按以下浓度配置ATP标准曲线测定液: 0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 μ mol/g. 经线性回归分析后所得标准曲线为: $Y = 0.703X + 8.699$, $R^2 = 0.9874$.

TNF- α 处理后LO2细胞内ATP浓度显著下降 ($P < 0.05$), 而ROS生成水平则显著升高 ($P < 0.05$); 转染pEGFP-Mfn2质粒后, 细胞内ATP浓度显著升高 ($P < 0.05$), 而ROS生成水平较前均显著下降 ($P < 0.05$), TNF- α 处理转染组细胞后ATP下降水平要显著低于未转染组, 而未转染组ROS升高程度则显著高于转染组 ($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

TNF- α 是一种具有广泛生物学功能的多肽类细胞因子, 参与内毒素性休克、炎症、免疫调节、细胞增生、细胞毒活性和抗病毒等过程. 肝脏细胞表面含有丰富的TNF- α 受体, 是其作用的主要靶器官. 在各种肝脏损伤性疾病损伤过

程中, TNF- α 作为炎症反应的始发细胞因子, 其作用越来越引起人们的关注^[8]. TNF- α 参与肝损伤的病理过程途径主要有两种: 一种为细胞外途径, 由肝细胞表面的受体介导; 另一种为细胞内途径, 主要由线粒体损伤介导, 但具体分子机制并不清楚.

肝脏是体内最大的代谢器官, 线粒体是肝细胞代谢的核心. 线粒体是高度动态的细胞器, 他们在细胞内彼此连接呈三位网络状. 同时, 线粒体在细胞内发生着频繁的融合与分裂, 线粒体融合对线粒体正常功能的发挥具有非常重要的作用. Mfn2是我国学者陈光慧利用差异显示技术得到的一个新基因, 在哺乳动物中, Mfn2对于线粒体融合事件是必需的^[9,10], 阻断Mfn2可导致葡萄糖氧化的减少、细胞呼吸、线粒体的基质渗漏和膜电位^[11], Mfn2通过维持线粒体的网状结构影响线粒体的新陈代谢. 我们研究发现, TNF- α 可以显著抑制肝细胞Mfn2基因的转录与表达, 并使LO2细胞线粒体从长管状或网状变成小球形或点状, 而高表达Mfn2可以逆转线粒体形态的破坏, 可见抑制Mfn2基因表达是TNF- α 诱导肝细胞线粒体形态变化的重要途径之一.

线粒体的正常呼吸、生成ATP的功能对维持组织器官功能和细胞结构的完整至关重要. ATP含量决定了细胞对应激的反应能力, 如果其含量降低, 会导致细胞对应激的反应不足而引起肝细胞的严重损伤. 因此组织中ATP的水平与组织细胞功能状态及其生命力直接相关^[12]. 而线粒体功能障碍导致的ROS产生增加在人类各

■同行评价

本文创新性较好,具有一定的临床参考价值.

种肝脏损伤性疾病中都能被观察到. 线粒体既是ROS形成的主要部位,也是ROS攻击的首要靶点. ROS通过传递1个或2个电子,氧化大分子物质,引起DNA损害、蛋白质和脂质等氧化和再氧化损害^[13]. 研究证实TNF- α 能诱导各种类型细胞ROS的生成^[14-16],该过程具体机制并不十分清楚. 本实验结果显示, TNF- α 能显著抑制肝细胞ATP生成水平并大量诱导ROS生成,但转染Mfn2基因后能显著抑制这一过程,说明TNF- α 可通过抑制Mfn2基因导致线粒体功能损伤. Chen等^[9]发现Mfn2表达缺失时细胞呼吸率下降,进一步检测发现呼吸链中复合体I、III、IV的电子转移率下降. 这种变化将导致ATP生成减少,细胞内能量障碍使还原性谷胱甘肽减少,对ROS产物清除能力下降,使ROS水平升高. 本实验结果说明Mfn2基因可能是TNF- α 导致细胞ATP生成减少及ROS水平升高的关键因子.

总之,通过实验我们发现TNF- α 能显著下调肝细胞Mfn2的表达,导致线粒体融合障碍及功能损伤,而高表达Mfn2能抑制TNF- α 对肝细胞线粒体的破坏作用. 该结果揭示了TNF- α 介导线粒体损伤新的分子机制,为治疗TNF- α 所导致的肝脏损伤性疾病提供了新的药物治疗靶点,但TNF- α 是通过何种机制调控Mfn2基因表达尚有待深入研究.

4 参考文献

- 1 Domm S, Cinatl J, Mrowietz U. The impact of treatment with tumour necrosis factor-alpha antagonists on the course of chronic viral infections: a review of the literature. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1217-1228
- 2 Auguet T, Vidal F, López-Dupla M, Broch M, Gutiérrez C, Olona M, Oltra C, Aguilar C, González E, Quer JC, Sirvent JJ, Richart C. A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend* 2008; 92: 91-99
- 3 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314
- 4 El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, Rossi B, Gugenheim J. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford)* 2007; 9: 112-119
- 5 Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1813-H1820
- 6 Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2726-H2737
- 7 Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S. Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J Cell Sci* 2005; 118: 3153-3161
- 8 Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 445-454
- 9 Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160: 189-200
- 10 Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; 280: 26185-26192
- 11 Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 2005; 567: 349-358
- 12 Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl* 2007; 13: 382-390
- 13 Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-G589
- 14 Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107: 1418-1423
- 15 Li J, Li Q, Xie C, Zhou H, Wang Y, Zhang N, Shao H, Chan SC, Peng X, Lin SC, Han J. Beta-actin is required for mitochondria clustering and ROS generation in TNF-induced, caspase-independent cell death. *J Cell Sci* 2004; 117: 4673-4680
- 16 Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 789-794

编辑 李军亮 电编 何基才