文章编号:1000-5404(2005)01-0039-04

论著

几种肿瘤细胞株线粒体 DNA 多态性

戴纪刚[1],闵家新[1],魏 泓[2],张国强[1],周人杰[1] (第三军医大学:[1]新桥医院胸外科,重庆 400037,[2]实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 了解和分析线粒体 DNA 突变与肿瘤发生发展的关系。**方法** 应用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 技术对 Lewis 肺癌等肿瘤细胞株 mtDNA 的 D-loop, ND3 and $tRNA^{Met+Glu+Ile}$ 基因片段进行了分析。**结果** mtDNA 编码区的 $tRNA^{Met+Glu+Ile}$ 及 ND1 基因核酸片段经 Hae Ⅲ等 16 种内切酶消化后,这些肿瘤细胞株表现出完全相同的酶切图谱。而 D-loop 片段,小鼠肿瘤 Hca-F 出现了与对照小鼠不同的酶切方式;用 PCR-SSCP 分析方法对这些肿瘤细胞株 mtDNA 的 D-loop 的 5′及 3′端作进一步分析,在研究的 6 个肿瘤中,有 4 个在 mtDNA 非编码区上存在着突变。**结论** mtDNA 突变在肿瘤的发生发展中可能起一定作用。

关键词:肿瘤;线粒体 DNA;突变
中图法分类号:R394-33; R394.2; R73-354 **文献标识码**:A

Analysis of mutation of mtDNA from tumor cell lines

DAI Ji-gang[1], MIN Jia -xin[1], WEI Hong[2], ZHANG Guo-qiang[1], ZHOU Ren-jie[1]([1]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Experimental Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between mutations of mtDNA and carcinogenesis. **Methods** The variations of D-loop, ND3, and $tRNA^{Met+Glu+Ile}$ gene fragments of mtDNA from six tumor cell lines of mice were analyzed by PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques. **Results** After being digested with 16 restriction endonucleases, all restriction patterns of ND3 and $tRNA^{Met+Glu+Ile}$ gene fragments were the same in these tumors, whereas D-loop of mtDNA from Hca-F had an additional endonuclease site in contrast to the controls. The D-loop of mtDNA was found to possess mutations in 4 of 6 tumors by PCR-SSCP. **Conclusion** mtDNA mutations may contribute to the carcinogenic process.

Key words: tumor; mitochondrial DNA; mutation

真核细胞除了核基因组外,还存在核外基因组,即线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)。mtDNA 的信息结构显示出自然界少有的合理性和经济性,在长仅仅约 16.5 kb 的基因组内,定位了 2 种 tRNA,22 种 rRNA 和 13 种蛋白质的基因。作为重要的核外遗传物质,由于其相对分子量小,缺乏组蛋白保护,易受致癌物攻击,且缺乏损失修复系统,因此是致癌物作用的重要靶点。mtDNA 突变与肿瘤发生发展之间的关系已引起重视[1,2]。近交系小鼠具有高度的遗传学稳定性和基因型的均一性。为此我们以 Lewis 肺癌等 6 个近交系小鼠自发或诱发肿瘤及相关小鼠品系为实验材料,采用 PCR 技术结合限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)和单链构象多态性分析(PCR-SSCP)方法,对其 mtDNA D-loop、$tRNA^{Met+Glu+Ile}$ 和 ND3 基因片段的遗传结构进行了研究。

1 材料和方法

1.1 肿瘤细胞株及对照小鼠

Lewis 肺癌,IA795、Hca-F 、Hca-P、CT26、SCC891 6 个肿瘤细胞株购自中科院上海细胞库及第三军医大学实验动物中心,其均为近交系小鼠自发或诱发肿瘤。其中肺癌 Lewis、IA795 来源于 C57BL/6J;肝癌 Hca-F 、Hca-P 来源于 C3H;结肠癌 CT26、乳腺癌 SCC891 来源于 BALB/c 小鼠。C57BL/6J、C3H、BALB/c 近交系小鼠均购自第三军医大学实验动物中心,分别作为上述相应肿瘤细胞株之正常对照。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Alu* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*stu* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Hae* Ⅱ购自德国宝灵曼公司和美国 Promega 公司;多聚酶链反应(PCR)试剂盒系德国宝灵曼公司产品;其它生化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900173);第三军医大学科研基金资助项目(2000)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900173) and the Scientific Research Fund of Third Military Medical University (2000)
作者简介:戴纪刚(1971-),男,湖南省双峰县人,博士,主治医师,主要从事肿瘤遗传学方面的研究,发表论文 30 余篇。电话:(023)68774616
收稿日期:2004-07-17;**修回日期**:2004-10-11

试剂系国产分析纯。

1.3 mtDNA 的提取

核质分离法提取上述鼠肝脏细胞 mtDNA[3]。

1.4 PCR 扩增

所用引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成，具体见表 1。

表 1 引物名称及序列

Tab 1 Primers and sequences and the length of the amplified fragments

Name	Length (bp)	Position	Primer sequences
D-loop	1 100	L(15294-15320)	5′-ATAAACATTACTCTGGTCTTGTAAACC -3′
		H(98-72)	5′-ATTAATAAGGCCAGGACCAAACCT -3′
tRNA$^{Met+Glu+Ile}$	1 126	L(3401-3419)	5′-CGGCCCATTCGCGTTATTC-3′
		H(4527-4508)	5′-AGGTTGAGTAGAGTGAGGGA-3′
ND3 fragment	534	L(9364-9385)	5′-ACGTCTCCATTTATTGATGAGG-3′
		H(9897-9876)	5′-GAGGTTGAAGAAGGTAGATGGC-3′
D-loop 5′	342	L(15371-15389)	5′-CCACCACCAGCACCCAAAG-3′
		H(15712-15694)	5′-CGGGTTGTTGGTTTCACGG-3′
D-loop 3′	437	L(15950-15958)	5′-AGGCATGAAAGGACAGCAC-3′
		H(91-73)	5′-ATAAGGCCAGGACCAAACC-3′

建立 100 μl 反应体系，内含 0.5 μg 总 DNA 为模板，先经 94 ℃ 变性 5 min，加入 1 μl(4 U/μl)的 *Taq* 酶循环 30 个周期(每个周期 94 ℃ 30 s、55 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min)，最终 72 ℃延长 10 min。

1.5 D-loop、tRNA$^{Met+Glu+Ile}$、ND3 基因片段限制性内切酶酶切分析

逐一取扩增产物 5 μl，分别加入 2 U 的限制性内切酶和 1.2 μl 10×酶切缓冲液，加灭菌水至 12 μl，37 ℃温育过液。扩增产物酶切消化后，用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析，电泳液为 TBE 缓冲液，以 3 V/cm 电泳 1～2 h，紫外灯下观察并拍照。酶切片段长度测定以华美公司标准 Marker(以 PBR322 为底物，*Hind* Ⅲ等 6 种酶水解)酶切片段为分子量标准，利用电泳迁移率与分子量对数间的线性关系，测得各酶切片段分子量。

1.6 D-loop 5′端及 3′端单链构象多态性分析

PCR 扩增产物 5 μl 与等体积加样缓冲液混合，95 ℃变性 5 min 后，迅速冰浴 10 min，9% 非变性聚丙烯酰胺凝胶，20 ℃恒温，15 mA 电泳 3～5 h。电泳完毕，用常规方法固定、银染、显色，拍照分析结果，并将凝胶真空抽干保存。

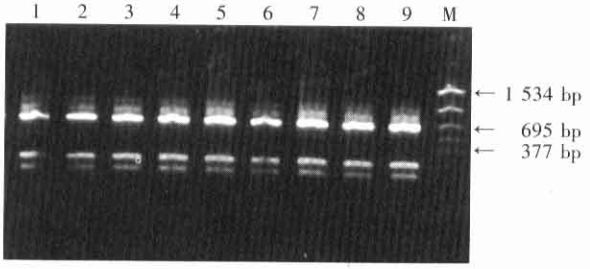
2 结果

2.1 PCR 扩增结果

肿瘤细胞株 Lewis、IA795、Hca-P、Hca-F、CT26、SCC891 及近交系小鼠 C57BL/6J、C3H、BALB/c 的 mtDNA 样品均扩增出长 1 100 bp的 mtDNA D 环片段、长 1 126 bp 的 tRNA$^{Ile+GlN+Met}$基因片段、长 534 bp 的 ND3 基因片段，无阴性扩增结果，亦未发现扩增片段长度多态性。

2.2 D 环、tRNA$^{Met+Glu+Ile}$、ND3 基因片段限制性内切酶酶切分析结果

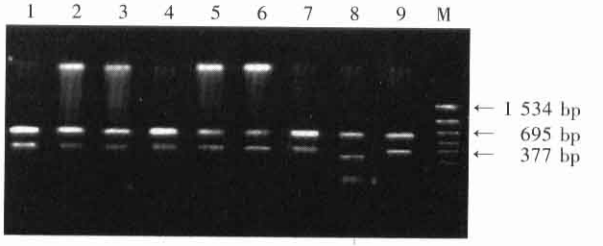
结果发现，在采用的 16 种限制性内切酶中，6 个肿瘤细胞株 Lewis、IA795、Hca-P 、Hca-F、CT26 和 SCC891 的 mtDNA 基因编码区核酸片段(ND3、tRNA$^{Ile+GlN+Met}$)的酶切格局及酶切片段大小完全相同，在 27 个限制性内切酶酶切位点上均无差异。见图 1 及表 2。而在非编码区(D-loop)，与对照小鼠相比，Hca-F 出现了 *Hinf* Ⅰ的新酶切位点，Hca-F 肿瘤细胞株出现了 700、312、88 bp 3 个片段，400 bp 片段消失(图 2)。



1: C57BL/6J; 2: Lewis; 3: IA795; 4: BALB/c; 5: SCC891; 6: CT26; 7: C3H; 8: Hca-F; 9: Hca-P; M: PCR standard marker

图 1 tRNA$^{Ile+GlN+Met}$ *Bam*H Ⅰ酶切结果

Fig 1 Restriction patterns of tRNA$^{Ile+GlN+Met}$ digested with *Bam*H Ⅰ



1: C57BL/6J; 2: Lewis; 3: IA795; 4: BALB/c; 5: SCC891; 6: CT26; 7: C3H; 8: Hca-F; 9: Hca-P; M: PCR standard marker

图 2 D-loop *Hinf* Ⅰ酶切结果

Fig 2 Restriction patterns of D-loop *Hinf* Ⅰ

表 2 mt DNA tRNA$^{Ile+GlN+Met}$、ND3 片断酶切结果

Tab 2 Murine mtDNA, tRNA Ile+GlN+Met fragment, and ND3 fragments digested with enzymes

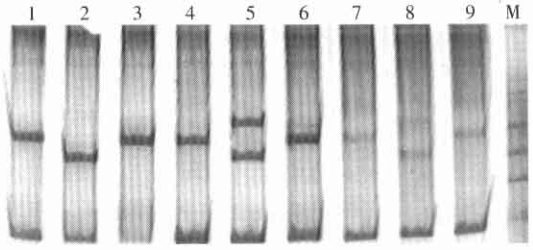
Enzyme	tRNA$^{Ile+GlN+Met}$(1 126 bp)		ND3 (534 bp)	
	Endonuclease sites	Fragment length	Endonuclease sites	Fragment length
Hae Ⅲ	4	470,290,136…	1	392,142
Hinf Ⅰ	0	1126	4	253,84…
Apa Ⅰ	1	658,469	0	534
Alu Ⅰ	3	665,318,135…	1	310,224
*Bam*H Ⅰ	2	710,252,164	0	534
Dra Ⅰ	1	634,493	1	451,83
Stu Ⅰ	2	605,297,225	1	391,143
Nde Ⅱ	0	1126	0	534
Rsa Ⅰ	4	392,259,228…	2	353,103,78
Xba Ⅰ	0	1126	0	524

There are no endonuclease sites by other restriction enzymes

2.3 D-loop 5′端及 3′端单链构象多态性分析结果

为进一步分析近交系肿瘤细胞株 mtDNA 的遗传变异，我们对 T739、TA2、615、BALB/c、C3H、C57BL/6J、DBA/2 肿瘤细胞株 mtDNA 的高变异区，D-loop 的 5′端和 3′端进行了 SSCP 分析，结果发现，D-loop 的 3′端 SSCP 分析发现，3 个正常对照小鼠及肿瘤

Hca-P、CT26 和 IA795 表现为相同的 SSCP 电泳带型，而 Lewis、Hca-F 和 SCC891 出现了异常的单链构象，表现为电泳带的异位或出现异常的电泳带（图 3）；D-loop 的 5′端 SSCP 分析发现，与对照小鼠相比，CT26 出现了异常的单链构象，表现为电泳带的异位。



1：C57BL/6J；2：Lewis；3：IA795；4：BALB/c；5：SCC891；6：CT26；7：C3H；8：Hca-F；9：Hca-P；M：PCR standard marker

图 3　D-loop 3′端 SSCP 分析结果

Fig 3　SSCP analysis of D-loop 3′ fragment

3　讨论

线粒体与癌发病关系的研究可追溯到 20 世纪 70 年代以前。过去的研究主要集中在肿瘤细胞线粒体的形态和能量代谢等方面，发现大多数癌细胞线粒体发育不良，糖的有氧代谢减弱而无氧酵解明显增强等。20 世纪 60 年代以后，随着 mtDNA 的发现，人们迅速把目光转向 mtDNA 突变与癌发病关系的研究上。细胞中 mtDNA 突变的种类可分为异质性和同质性突变，目前已在人肝癌、结肠癌、胃癌、肺癌及乳腺癌等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现有 mtDNA 的突变[4~7]，而且有不少为同质性突变。在这些突变中，虽然有的突变被发现有明显的致病性，伴随有线粒体形态改变和 mtDNA 某些基因表达的下降，但它们的生物学意义尚不清楚。从理论上来讲，这些突变可通过改变细胞能量产量、提高线粒体氧化压力（oxidative stress）和/或调控凋亡等途径而影响细胞的生物学行为。

本实验应用核质分离法制备肿瘤细胞 mtDNA，并对 mtDNA 264 bp 片段缺失发生区的 $tRNA^{Ile+GlN+Met}$ 基因片段和 mtDNA 4 977 bp 片段缺失高发区的 ND3 基因以及 D-loop 进行了扩增分析。研究发现，无阴性扩增结果，亦无扩增片段长度多态性。结果表明，在这 6 个肿瘤细胞株的 3 个 mtDNA 核酸片段中均未发现大片断缺失现象。这一现象说明，这些肿瘤细胞株 mtDNA 结构具有高度的保守性，可能并不存在 mtDNA 片段缺失突变。这一结果与其他学者发现的肿瘤患者癌组织细胞中 mtDNA 片段缺失状况[8,9]稍有差异。推测其原因，可能是肿瘤细胞株在长期、反复的传代培养中，发生了片段缺失突变的 mtDNA 分子通过线粒体 DNA 复制的非随机分离机制而被有效的清除。而在肿瘤患者中所发现的 mtDNA 片段缺失突变，我们认为，可能并不是肿瘤特异的，而是这些患者正常老化过程中积累的结果。

mtDNA 的非编码区是 mtDNA 的控制区（control region），占全部 mtDNA 分子的 6% 左右，在 mtDNA 的转录和复制的控制中起重要作用。一些研究表明[10,11]：在头颈部肿瘤、膀胱癌、乳腺癌和结肠癌等肿瘤中，非编码区是 mtDNA 突变的热点区域。我们的研究表明：这 6 个肿瘤细胞株 mtDNA 的 $tRNA^{Met+Glu+Ile}$ 及 ND1 基因核酸序列，在 27 个限制性内切酶酶切位点上均无差异。而在 mtDNA 非编码区，Hca-F 出现了 *Hinf* Ⅰ的新酶切位点。导致出现 *Hinf* Ⅰ新切点的原因，可能是肿瘤细胞在第 16 268 位核苷酸发生了 T∶C/A∶G 的置换突变。结果表明，本组癌细胞系 mtDNA 结构基因区（编码区）一级结构相当稳定，主要的遗传改变可能位于其 mtDNA 非编码区。这一结论与 mtDNA 分子的结构特点相符合。近年来，一些研究表明[12~14]，在肿瘤及肿瘤细胞株中，mtDNA 的拷贝数（copy number）可不同程度的增加，mtDNA 某些基因的表达水平发生明显改变。这说明肿瘤细胞 mtDNA 的转录和复制出现了失控。我们用 PCR-SSCP 分析方法对 Lewis 肺癌等肿瘤 mtDNA 非编码区的 5′及 3′端突变进一步分析发现，在研究的 6 个肿瘤中有 4 个在 mtDNA 的非编码区上存在着突变。mtDNA 的非编码区是 mtDNA 的控制区，其区域内有 mtDNA 重链转录 的启动子（heavy-strand promotor，HSP）、轻链转录 的启动子（light-strand promotor，LSP）和重链复制起始点（original of heavy strand，OH）。同时，它也是线粒体基因组和核基因组信息交换的枢纽。其在 mtDNA 的转录和复制的控制中起重要作用。因此，我们认为，mtDNA 非编码区的突变可能与肿瘤细胞中 mtDNA 的复制和转录水平的变化有关，至于其分子机制及生物学意义有待于进一步探讨。

参考文献：

[1] Penta J S, Johnson F M, Wachsman J T, *et al*. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Mutat Res, 2001, 488(2): 119 - 133.

[2] 胡义德，钱桂生，毛宝龄，等. 线粒体 DNA 片段诱导小鼠胚胎成纤维细胞恶性转化[J]. 中华病理学杂志，2000, 29(1): 39 - 42.

[3] 戴纪刚，吴宇格，魏　鸿，等. 一种简单快速制备动物线粒体 DNA 制备的方法[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(4): 391 - 392.

[4] Copeland W C, Wachsman J T, Johnson F M, *et al*. Mitochondrial DNA alterations in cancer[J]. Cancer Invest, 2002, 20(4): 557 - 569.

[5] Chinnery P F, Samuels D C, Elson J, *et al*. Accumulation of mitochondrial DNA mutaiions in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism[J]? Lancet, 2002, 360(9342): 1323 - 1325.

[6] Matsuyama W, Nakagawa M, Wakimoto J, *et al*. Mitochondrial DNA mu-

tation correlates with stage progression and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Hum Mutat, 2003, 21(4): 441 - 443.
[7] 戴纪刚，张国强，魏 泓. 线粒体DNA与肿瘤[J]. 第三军医大学学报，1999，21(9)：691 - 693.
[8] Kotake K, Nonami T, Kurokawa T, *et al*. Human livers with cirrhosis and hepatocellular carcinoma have less mitochondrial DNA deletion than normal human livers[J]. Life Sci, 1999, 64(19): 1785 - 1791.
[9] Lee H C, Yin P H, Yu T N, *et al*. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues-effects of betel quid chewing and oral cancer [J]. Mutat Res, 2001, 493(1-2): 67 - 74.
[10] Miyazono F, Schneider P M, Metzger R, *et al*. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus[J]. Oncogene, 2002, 21(23): 3780 - 3783.
[11] Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, *et al*. Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients[J]. Int J Cancer, 2001, 94(3): 429 - 431.
[12] Liang B C, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas[J]. Cancer Lett, 1996, 105(2): 167 - 173.
[13] Holt I J, Dunbar D R, Jacobs H T. Behaviour of a population of partially duplicated mitochondrial DNA molecules in cell culture: segregation, maintenance and recombination dependent upon nuclear background[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(8): 1251 - 1260.
[14] Faure Vigny H, Heddi A, Giraud S, *et al*. Expression of oxidative phosphorylation genes in renal tumors and tumoral cell lines[J]. Mol Carcinog, 1996, 16(3): 165 - 172.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)01-0042-01

1 462例原发性支气管肺癌临床特点分析

Clinical characteristics of 1 462 cases of primary bronchogenic lung cancer

王建春，钱桂生 （第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所，全军呼吸病研究重点实验室，重庆 400037）

近年来肺癌发病率在发达国家呈上升趋势，肺癌是男性因肿瘤死亡的第1位死因，女性的第1,2位死因[1]。本研究回顾性分析我院1991 - 2002年肺癌患者的临床特点，为肺癌的早期诊断和治疗提供参考。

1 临床资料

本研究收集1991 - 2002年在我院经病理学或细胞学确诊为肺癌的1 462例患者的临床资料，分析如下。

1.1 年龄分布

1 462例患者，年龄最大86岁，最小21岁，平均(55.7 ± 11.4)岁，男性1 171例，女性291例。其中40 - 69岁患者共1 183例，占80.9%，发病高峰集中在50 ~ 59岁(487例，33.3%)。

1.2 主要症状和就诊时持续时间

患者常以咳嗽(1 137例，77.8%)，咯血(590例，40.4%)，胸背痛(472例，32.3%)和呼吸困难(248例，17.0%)为主要症状就诊。从症状出现到就诊的持续时间不等，从1 d到数年，其中位数时间分别为3,2,2,1个月。另外，还有部分患者可能单独或合并以下症状：声嘶(60例)，发热(50例)，头昏头痛(40例)，关节痛(31例)，腰痛(29例)，颜面浮肿(20例)，四肢疼痛(7例)。另有36例因发现颈部包块就诊，仅有30例因常规体检发现肺部阴影而就诊。

1.3 肺部基础疾病

242例患者有慢性阻塞性肺疾病(COPD)，有125例患者曾患肺结核，12例支气管扩张症，8例曾患肺炎，5例矽肺患者，4例有肺脓肿病史，3例患者患有哮喘。

1.4 组织学类型

1 462例患者均通过纤维支气管镜、痰、心包积液和胸水脱落细胞学、经皮针吸肺活检、淋巴结活检和开胸手术获取组织学和细胞学标本并结合胸部影像资料而明确诊断。其中，鳞癌582例(39.8%)，腺癌482例(33.0%)，小细胞肺癌244例(16.7%)，肺泡细胞癌82例(5.6%)，其它36例。有36例未能确定病理类型。男、女患者的组织学类型差异显著。女性患者以腺癌为主(164例，56.4%)，其次为鳞癌(52例，17.9%)和小细胞肺癌(47例，16.2%)。男性患者以鳞癌为主(530例，45.3%)，其次为腺癌(318例，27.2%)和小细胞肺癌(197例，16.8%)。在明确病灶部位的1 427例中，左侧共645例(44.1%)，其中左上叶病灶417例(64.7%)；右侧762例(52.1%)，右上叶418例(54.9%)；上叶发病率显著高于中下叶($\chi^2 = 201.6$, $P < 0.001$)。双肺病变21例。

1.5 吸烟与肺癌组织学类型

1 462例肺癌中，共有1 084人(74.2%)有吸烟史。根据吸烟指数分为：200年支以下(76人)，201 ~ 400年支(212人)，401 ~ 600年支(402人)，601 ~ 800年支(188人)和800年支以上(206人)，最高达3 000年支。吸烟指数在200年支以下的患者，腺癌占50%，其次是鳞癌和小细胞肺癌。200年支以上的患者，以鳞癌约占50%，其次为腺癌和小细胞。在吸烟指数200年支以上的所有患者，鳞癌、腺癌和小细胞所占比例相对稳定，无显著差异($\chi^2 = 6.17$, $P > 0.05$)。吸烟组与非吸烟组患者比较($\chi^2 = 269.7$, $P < 0.001$)，吸烟组鳞癌发生率显著高于非吸烟组，但腺癌和肺泡细胞癌发病率显著低于非吸烟组，小细胞癌发生率两组间无显著差别。

（下转45页）

作者简介：王建春(1968 -)，男，四川省乐山县人，博士，副主任医师，副教授，主要从事急性肺损伤、肺部炎症性疾病方面的研究，发表论文20余篇。电话：023-68774603

收稿日期：2004-09-08，修回日期：2004-10-11