论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0234-04

人骨肉瘤组织线粒体DNA控制区PCR-RFLP分析

郭学光,郭乔楠 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 比较分析人骨肉瘤组织mtDNA控制区的序列和正常人的差异。**方法** 用*Apa* Ⅰ,*Ava* Ⅱ,*Bam*HⅠ,*Eco*RⅤ,*Hae*Ⅲ和*Kpn* Ⅰ共6种限制性内切酶,对20例骨肉瘤组织进行了PCR产物限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析。**结果** 20例骨肉瘤组织DNA均扩增出长1 451 bp的线粒体控制区特异性目的片段,没有发现长度多态性。8例骨肉瘤组织在mtDNA 16 519位核苷酸处发生了T→C的突变,占40%(8/20),其中骨母细胞型4例,占40%(4/10),软骨母细胞型2例,占40%(2/5),纤维母细胞型2例,占40%(2/5),各亚型之间没有显著性差异($P>0.05$);7例组织第16 132位核苷酸处的A缺失,占35%(7/20),其中骨母细胞型3例,占30%(3/10),软骨母细胞型2例,占40%(2/5),纤维母细胞型2例,占40%(2/5),各亚型之间没有显著性差异($P>0.05$);4例组织既有16 519位核苷酸处T→C的突变,又有16 132位A的缺失,占20%(4/20)。这两种突变在20例骨肉瘤病例以及各亚型中占的比例均显著高于正常人群相应位点的多态性变异。**结论** 这两种突变在骨肉瘤细胞mtDNA中发生率较高,可能在骨肉瘤的发生发展中发挥重要的作用。

关键词: 骨肉瘤;线粒体DNA;限制性片段长度多态性;突变

中图法分类号: R394-33; R394.3; R738.1 **文献标识码:** A

PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region in patients with osteosarcoma

GUO Xue-guang, GUO Qiao-nan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine if the mutation rates of mitochondrial DNA (mtDNA) control region in patients with osteosarcoma are higher than those of the healthy human, and to discover the possible specific mutations of mtDNA control region in patients with osteosarcoma. **Methods** Total DNA, extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from 20 cases of osteosarcoma by Goelz's method, was studied by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for mutations within the mtDNA control region. **Results** The T16519C mutation was detected in 8 out of 20 (40%) samples and the rates of this mutation were 40% (4/10), 40% (2/5), and 40% (2/5) in osteoblastic, fibroblastic, and chondroblastic osteosarcoma, respectively. There was no significance between three subtypes of osteosarcoma ($P>0.05$). The A deletion in the nucleotide position 16132 (5′ end) was found in 7 (35%) out of 20 samples. No significant difference was ($P>0.05$) found between the three subtypes of osteosarcoma with rates of the A deletion being 30% (3/10), 40% (2/5), and 40% (2/5) in three subtypes, respectively. The T16519C mutation and the A deletion in the nucleotide position 16 132 (5′ end) were co-detected in 4 (20%) out of 20 samples. The levels of the two mutations in patients with osteosarcoma were significantly higher than those in healthy human. **Conclusion** The two mutations have high rates in osteosarcoma and may play an important role in carcinogenesis and progression of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; mitochondrial DNA; PCR-RFLP; mutation

线粒体基因组(mitochondrial genomes, mt-genomes)是双链环形分子,除病毒基因组外,它是生物圈中最经济的DNA配置形式。人类线粒体基因组只有16 569 bp[1],所有基因无间断地排列,基因之间没有非编码区,它的非编码区集中在16 024 bp和576 bp之间共计1 122 bp,称为D-LOOP(displacement-LOOP);因其调控整个线粒体DNA(mtDNA)的复制和转录,又称为控制区。由于线粒体是氧化磷酸化的场所,mtDNA缺乏组蛋白的保护,mtDNA分子是直接暴露于氧自由基的环境中,而mtDNA的复制和修复依赖于核基因,因此mtDNA的突变率显著高于核基因组[2];D-LOOP还是mtDNA和线粒体膜的结合位点,受脂质过氧化物的影

作者简介:郭学光(1976-),男,山东省烟台市人,硕士研究生,助教,主要从事骨肿瘤方面的研究。电话:(023)65399059

通讯作者:郭乔楠,电话:(023)68754432

收稿日期:2004-10-17;修回日期:2005-01-10

响很大，导致控制区的突变率高于 mtDNA 的编码区[3]。因此，控制区的突变在肿瘤发生中的作用和地位越来越受到重视。我们采用 PCR-RFLP（Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism）方法，对 20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区的序列特征进行了分析。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品，*Taq* 酶为 Takara 公司产品，dNTP 购自 Sangon 公司，限制性内切酶包括：*Apa* Ⅰ，*Ava* Ⅱ，*Bam*HⅠ，*Eco*RⅤ，*Hae*Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ共 6 种，均为 TaKaRa 公司产品，分子量标准为 TaKaRa 公司的 DL2000 DNA Marker。

1.2　标本来源

收集第三军医大学西南医院和重庆肿瘤医院骨肉瘤术后标本 20 例。其中骨母细胞型 10 例，软骨母细胞型 5 例，纤维母细胞型 5 例。

1.3　骨肉瘤组织 DNA 的提取

20 例术后骨肉瘤标本经甲醛固定，石蜡包埋，取 10 张 10 μm 厚石蜡组织薄片，按照 Goelz 氏 DNA 提取方法[4] 提取总 DNA（其中包括 mtDNA），后溶于 TE 缓冲液，－20 ℃保存待用。

1.4　引物

参照正常人 mtDNA 剑桥序列[1]，按照引物设计原则，设计了一对特异性引物，引物序列分别为：P1：5′-GAATCGGAGGACAACCAGTA-3′，P2：5′-TGATGTGAGCCCGTCTAAAC-3′。它们分别位于 mtDNA Cytb 和 12 S rRNA 基因区内，扩增包括1 122 bp 控制区序列在内的1 450 bp 片段。由 Sangon 公司合成。

1.5　PCR 扩增

以 1 μg 组织总 DNA 为模板，PCR 反应总体积为 50 μl。采用热启动 PCR 扩增，以提高产物的特异性：将除 *Taq* 酶以外的所有反应成分加入 0.2 ml PCR 管中，短暂离心，94 ℃预变性 5 min，温度维持于 80 ℃，加入 *Taq* 酶，进入以下循环：94 ℃变性 45 s，53 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 2 min，共计 35 个循环，最后于 72 ℃ 延伸 5 min 结束。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有特异性的 PCR 产物生成。

1.6　RFLP 分析

取 4 μl PCR 反应产物，加入限制性内切酶 5 U，于 37 ℃反应 4 h，取 10 μl 酶切产物于 1.5% 琼脂糖凝胶，8 V/cm 恒压电泳，BIORAD 凝胶成像分析系统中观察并拍照。

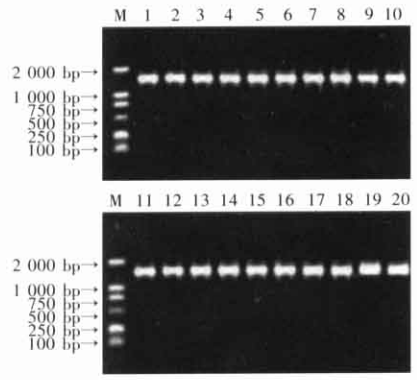
1.7　数据处理

以 TaKaRa 公司的 DL2000 DNA Marker 为分子量参照标准，分子量的对数值为横坐标，电泳的迁移率为纵坐标作图。利用电泳迁移率与分子量的对数值之间的线性关系计算出各酶切片断的分子量大小。利用 primer premier 5 软件分析正常人 mtDNA 剑桥序列中位于上述两个引物之间1 450 bp 片段的酶切位点。根据酶切片段分子量大小与正常人剑桥序列酶切片段大小进行对比，确定各酶切位点在 mtDNA 上的位置。

2　结果

2.1　PCR 扩增结果

20 例骨肉瘤组织 DNA 均扩增出长 1 451 bp 的线粒体控制区特异性目的片段（*Taq* 酶在扩增过程中在 3′端增加了一个 A），没有发现长度多态性（图 1）。



1－20：PCR products；M：DL2000 DNA marker

图 1　骨肉瘤组织 mtDNA 控制区 PCR 扩增结果

Fig 1　PCR products of mtDNA control region in osteosarcoma tissues

2.2　RFLP 结果

20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区 PCR 产物经限制性内切酶消化琼脂糖电泳分离后，可见到不同数目不同分子量大小的核酸片段，而且各核酸片段分子量的总和为1 451 bp。

2.2.1　*Apa* Ⅰ、*Ava* Ⅱ、*Bam*HⅠ和 *Eco*RⅤ四种内切酶的酶切结果　20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区表现出相同的酶切图谱，没有多态性，而且和 mtDNA 剑桥序列控制区的酶切格局完全相同（表 1）。

表 1　mtDNA 控制区 *Bam*HⅠ，*Eco*RⅤ，*Ava* Ⅱ和 *Apa* Ⅰ的酶切结果

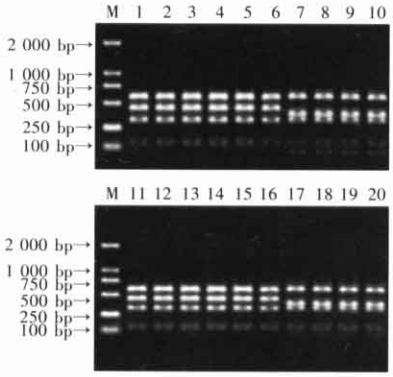
Tab 1　Results obtained by *Bam*HⅠ，*Eco*RⅤ，*Ava* Ⅱ and *Apa* Ⅰ in mtDNA control region

Enzyme	Recognition sequence	Fragment size (bp)		Size comparison with cambridge sequence
*Bam*HⅠ	G↓GATCC	1451		Same
*Eco*RⅤ	GAT↓ATC	1451		Same
Ava Ⅱ	G↓GTCC/G↓GACC	815	636	Same
Apa Ⅰ	GGGCC↓C	746	705	Same

2.2.2　*Hae*Ⅲ的酶切结果　20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区有 12 例出现了 129，314，435，573 bp（5′～3′）共 4 个片段，没有发现多态性，而且它们的酶切格局和人 mtDNA 剑桥序列控制区的酶切格局完全一致；其余的 8 例出现了 60 bp，375 bp 2 个新的片段，而 435 bp 片段消失，即在 702 bp 和 1 137 bp 之间出现了 1 个新的 *Hae*Ⅲ酶切位点将其分成 60 bp，375 bp 2 个片段，控制区的酶切片段变成了 5 个（图 2）。

2.2.3　*Kpn* Ⅰ的酶切结果　20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区有 13 例出现了 81 bp，297 bp 和1 073 bp（5′～3′）共 3 个片段，没

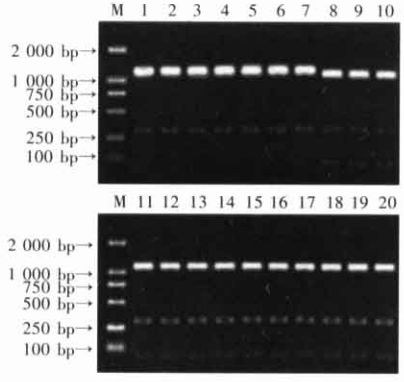
有发现多态性，其酶切结果和人 mtDNA 剑桥序列相应序列的酶切结果完全一致；其余的 7 例出现了 1 153 bp 的新的片段，而 81 bp 片段消失。这是因为控制区 PCR 产物 377 位的 A 缺失导致 *Kpn* Ⅰ在 378 位酶切位点的消失，其酶切片段变为两个(图 3)。



M: DL2000 DNA marker; 1 – 6 and 11 – 16: Results of PCR products of mtDNA control region in 12 osteosarcoma patients without the T16519C mutation by *Hae*Ⅲ; 7 – 10 and 17 – 20: Results of PCR products of mtDNA control region in 8 osteosarcoma patients with the T16519C mutation by *Hae*Ⅲ

图 2 mtDNA 控制区 PCR 产物被 *Hae*Ⅲ酶切后的电泳图

Fig 2 Electrophoretic pattern of PCR products of mtDNA control region by *Hae*Ⅲ



M: DL2000 DNA marker; 1 – 7: Results of PCR products of mtDNA control region in 7 osteosarcoma patients with the A deletion in the nucleotide position 16 132 by *Kpn* Ⅰ; 8 – 20: Results of PCR products of mtDNA control region in 13 osteosarcoma patients without the A deletion in the nucleotide position 16 132 by *Kpn* Ⅰ

图 3 mtDNA 控制区 PCR 产物被 *Kpn* Ⅰ酶切后的电泳图

Fig 3 Electrophoretic pattern of PCR products of mtDNA control region by *Kpn* Ⅰ

2.2.4 20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区 PCR 产物酶切位点的变化 20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区1 451 bp PCR 产物经过 6 种内切酶分析，结果显示：8 例组织在第 16 519 位核苷酸处发生了 T→C 的突变，从而使局部 GGTC 序列变成 GGCC，导致在第 16 518 位核苷酸处出现了 *Hae*Ⅲ新的酶切位点；7 例组织在第 16 132 位核苷酸处的 A 缺失，局部 GGTACC 序列变成 GGTCC，导致 *Kpn* Ⅰ在该处酶切位点的消失；其中有 4 例组织既有16 519位核苷酸处 T→C 的突变，又有 16 132 位 A 的缺失。

3 讨论

近十年来的研究发现线粒体基因组的缺陷和衰老、肿瘤、神经退行性疾病、肌病、心肌病以及糖尿病的关系密切。在肿瘤的研究方面，过去研究者主要注重线粒体的形态结构和能量代谢的异常；自从 Polyak[5] 发现结直肠癌中 mtDNA 基因型的变化以来，mtDNA 突变和肿瘤的发生的关系成为近年研究的热点，并且在多种肿瘤中都发现了 mtDNA 的突变[6~8]。

20 例骨肉瘤组织的 mtDNA 经过 PCR 均扩增出长 1 451 bp的线粒体控制区特异性目的片段，没有发现长度多态性。20 例组织 mtDNA 控制区 PCR 产物经 6 种限制性内切酶消化，电泳分离后，可见到数目不同分子量大小不等的核酸片段，而且核酸片段大小的总和均为1 451 bp。说明 20 例骨肉瘤组织 mtDNA 控制区分子量大小和正常人没有显著差别。进一步对 20 例组织 mtDNA 控制区 PCR 产物的限制酶酶切格局分析后发现：8 例组织在 mtDNA 第16 519位核苷酸处发生了 T→C 的突变，占 40%(8/20)，其中骨母细胞型 4 例，占 40%(4/10)，软骨母细胞型 2 例，占 40%(2/5)，纤维母细胞型 2 例，占 40%(2/5)，各亚型之间没有显著性差异($P>0.05$)；7 例组织在第16 132位核苷酸处的 A 缺失，占 35%(7/20)，其中骨母细胞型 3 例，占 30%(3/10)，软骨母细胞型 2 例，占 40%(2/5)，纤维母细胞型 2 例，占 40%(2/5)，各亚型之间没有显著性差异($P>0.05$)；4 例组织既有16 519位核苷酸处 T→C 的突变，又有16 132位 A 的缺失，占 20%(4/20)。这两种突变在 20 例骨肉瘤病例以及各亚型中占的比例均显著高于正常人群相应位点的多态性变异[9,10]。

mtDNA 控制区调控整个 mtDNA 的复制和转录，如果该区域出现异常，必将影响线粒体的功能。然而，内切酶分析只能检测酶切位点的变化，酶切位点以外的核苷酸序列有没有突变及突变类型还不得而知；而且目前还不知道这两种突变对线粒体的功能有何影响。因此，还不能确定这些突变是否会对人体产生功能性的影响。由于肿瘤的发生是一个涉及多步骤、多因素的复杂过程，这两种突变是否参与了这一过程以及在这一过程中发挥什么样的作用还不清楚，因此有必要对骨肉瘤 mtDNA 控制区进行进一步的研究。

参考文献：

[1] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(4): 457 – 465.

[2] Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, *et al*. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees[J]. Am J Hum Genet, 2001, 69(5): 1113 - 1126.

[3] Bendall K E, Macaulay V A, Baker J R, *et al*. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(6): 1276 - 1287.

[4] Goelz S E, Hamilton S R, Vogelestein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1985, 130(1): 118 - 126.

[5] Polyak K, Li Y, Zhu H, *et al*. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours[J]. Nat Genet, 1998, 20(3): 291 - 293.

[6] Fliss M S, Usadel H, Caballero O L, *et al*. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 287(5460): 2017 - 2019.

[7] Chen J Z, Gokden N, Greene G F, *et al*. Simultaneous generation of multiple mitochondrial DNA mutations in human prostate tumors suggests mitochondrial hyper-mutagenesis[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(9): 1481 - 1487.

[8] Kirches E, Mawrin C, Schneider Stock R, *et al*. Mitochondrial DNA as a clonal tumor cell marker: gliomatosis cerebri[J]. J Neurooncol, 2003, 61(1): 1 - 5.

[9] Cann R L, Wilson A C. Length mutations in human mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1983, 104(3): 699 - 711.

[10] 晋华黔, 吴立甫, 王　文, 等. 贵州汉族、苗族、布依族和水族人群线粒体 DNA 多态性研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(1): 1 - 11.

（编辑　龙　亮）

文章编号：1000-5404(2005)03-0237-01

个案与短篇

恒切牙龈下折裂的保存治疗

Treatment of subgingival fracture in permanent incisor

吴文慧[1]，王　琳[1]，杨　波[2]　（[1]华北煤炭医学院口腔系，[2]唐山市工人医院口腔正畸科，唐山 063000）

在口腔门诊中，牙齿外伤多见于前牙，当外伤为冠根折达龈下较深时，去除牙折段直接牙髓治疗桩冠修复，往往不能获得良好的固位及密合，引起牙龈炎症，造成治疗失败，一般采用牙拔除术。为保存患牙，自 1996 - 2002 年临床采用牙髓-正畸-修复联合方法处理患牙，垂直牵引断根至龈上，桩核冠修复，现对我院门诊治疗的 17 例患者进行分析如下。

1　资料和方法

1.1　临床资料

17 例恒前牙外伤患者共有冠根折患牙 19 颗，男性 12 例，女性 5 例，9 ~ 18 岁患者 11 例(13 颗患牙)，19 ~ 25 岁患者 6 例(6 颗患牙)；患牙情况：中切牙 13 颗，侧切牙 6 颗，其中上牙 14 颗，下牙 5 颗。

病例选则标准：主单发性冠根折，斜折或横折，折断线在龈下距离少于 5 mm，不合并牙槽骨骨折及牙龈撕裂伤，患牙两侧邻牙健康稳固，X 线片牙片示：牙根发育基本完成，牙根无畸形，无根尖周组织病变，牙根具有足够长度(保证牵引后修复的冠根比)。

1.2　治疗方法

局麻下拔除牙折段，氧化锌糊剂和牙胶尖完善根管治疗，2 周后行正畸牵引治疗。首先用 0.9 mm 钢丝弯制颈端带钩的牵引桩，长度为根长的 1/2，水门汀粘固于根管内。选用患牙两侧健康稳固的 2 - 3 颗邻牙作为支抗牙，于支抗牙唇面粘贴方丝弓托槽，用 0.45 mm 钢丝制作唇弓，在患牙位置弯制曲，牵引唇弓和牵引桩之间用结扎丝牵引，施加 20 g 左右牵引力，每 2 周复诊 1 次，牙根断面至龈上为止，保持 2 - 3 个月。牙龈修整术后行桩核冠修复。

成功标准：患牙修复体完好，无松动无叩痛，牙龈健康、无附着丧失，切缘与邻牙平齐，龈缘与同名牙对称，X 线片根尖周组织正常。

2　结果

1 年后复查，成功 17 颗，失败 2 颗(1 例修复体脱落，1 例出现叩痛，牙龈红肿，X 线片示根尖周病变)，成功率 89.5%。

3　讨论

对于前牙区冠根折达龈下较深位置的患牙，临床一般采取断根拔除术后前托牙或烤瓷桥修复，也可通过牙周手术暴露完整的牙根断面行桩冠或烤瓷冠修复。往往由于龈缘的不对称性破坏美观，牙周支持组织的减少亦可造成断根的松动，修复体边缘达龈下位置过深，引起龈炎，导致治疗与修复的失败。

采取龈下断根正畸牵引治疗，须严格掌握适应证，要求断根无弯曲畸形，根尖发育基本完成，根尖周组织正常，牙周组织健康，剩余根长大于或等于临床冠长，牙根折不合并牙槽骨骨

（下转 246 页）

作者简介：吴文慧(1969 -)，女，河北省唐山市人，副教授，主要从事口腔正畸方面的研究，发表论文 6 篇。电话：0315-3725038。

收稿日期：2004-09-15；修回日期：2004-11-11