文章编号:1000-5404(2005)14-1453-03

论著

线粒体DNA缺失对人肺癌细胞生长和侵袭能力的影响

凌贤龙[1],陆应麟[2],杜芝燕[2] ([1]第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037;[2]军事医学科学院基础医学研究所病理生物学研究室,北京 100850)

提 要:目的 探讨线粒体DNA损伤对人肺癌细胞生长和侵袭能力的影响。**方法** 采用溴化乙锭处理获得线粒体DNA缺失细胞;软琼脂集落形成实验检测细胞集落形成能力;Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力;MTT方法测定细胞生长状态。**结果** 线粒体DNA缺失细胞较之于其母本细胞系,具有更强的集落形成和侵袭能力,以及更明显的生长优势。**结论** 线粒体损伤可能参与了肺癌细胞恶性表型的形成。

关键词: 线粒体;线粒体DNA;肺癌;恶性表型
中图法分类号: Q527; R730.23; R734.2 **文献标识码:** A

Mitochondrial DNA deletion on the growth and invasiveness of human lung cancer cells

LING Xian-long[1], LU Ying-lin[2], DU Zhi-yan[2] ([1]Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Pathobiology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between mitochondrial DNA deletion and malignant phenotypes of human lung cancer cells. **Methods** Two rho$^-$ derivatives of 95C and 95D were generated by treating the cultured cells with ethidium bromide. Agarose colony formation assays and Transwell invasion assays were carried out to detect the phenotypes of colony formation and invasiveness of the cultured cells, respectively. Cell growth was determined by MTT. **Results** The partially mtDNA-deleted cells exhibited stronger capacity of colony formation and invasiveness, and faster growth rates than their respective parental cell lines. **Conclusion** Mitochondrial DNA deletion might play a role in the formation of malignant phenotypes of human lung cancer.

Key words: mitochondria; mitochondrial DNA; lung cancer; malignant phenotype

线粒体功能不全是肿瘤细胞最重要的特征之一,mtDNA突变见于多种肿瘤[1~3]。研究表明,正常细胞与转化细胞的线粒体存在显著差异。线粒体损伤是否参与肿瘤的形成,或者它们仅仅是肿瘤发生过程中的继发事件仍不清楚。将肿瘤细胞浆与正常细胞融合形成的杂交细胞可能表现肿瘤源性特征,提示细胞质成分可能参与了肿瘤的形成。本研究以肺癌转移模型细胞系95C/95D作为研究对象,探讨mtDNA损伤对人肺癌细胞生长和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系及培养条件

肺癌转移模型细胞系95C/95D由本室克隆和保存,在DMEM培养基,含10% FCS, 5% CO_2,37℃条件下进行培养。95D细胞集落形成和侵袭能力显著强于95C。

参照文献[4,5]报道方法用溴化乙锭处理培养细胞制备mtDNA缺失细胞(rho$^-$ 95C、rho$^-$ 95D)。mtDNA缺失状态判定采用PCR方法结合DNA测序。rho$^-$细胞培养条件:高糖DMEM培养基,含15% FCS、100 ng/ml丙酮酸、50 ng/ml 5-溴-脱氧尿嘧啶, 5% CO_2,37 ℃条件下进行培养。

1.2 软琼脂集落形成实验

以0.6%软琼脂均匀铺制底层,再将每孔约3 000个细胞

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,2002CB513105)和国家自然科学基金资助项目(30200141)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2002CB513105) and the National Natural Science Foundation of China (30200141)

作者简介:凌贤龙(1963-),男,安徽省合肥市人,博士,副教授,主要从事线粒体与肿瘤关系方面的研究。电话:(023)68774604, E-mail: lingxlong@sohu.com

收稿日期:2004-06-23;修回日期:2005-02-11

与0.35%软琼脂混合后均匀地铺制在软琼脂底层上，5% CO_2，37 ℃条件下培养14 d观察结果，记数40倍光镜下单个视野集落形成大小和数目。

1.3 Transwell细胞侵袭实验

Transwell培养板(corning costar，膜孔径8.0 μm)，于培养孔底部加入500 μl无血清NIH3T3细胞培养上清；Transwell杯底部加入100 μl Matrigel(1∶2，Beckton Dickinson)均匀铺制底层，在其面上加入5×10^4个细胞，5% CO_2，37 ℃，培养36 h后，轻轻拭去杯底部Matrigel和未浸润的细胞，以甲醛固定10 min，HE染色，光镜下(×200)观察并记录结果。

1.4 细胞生长状态分析

采用二甲基噻唑二甲基四唑嗅(dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium bromide，MTT)方法检测细胞生长状态，并绘制细胞生长曲线。

1.5 统计学方法

采用SPSS 10.0软件，行t检验和χ^2检验。

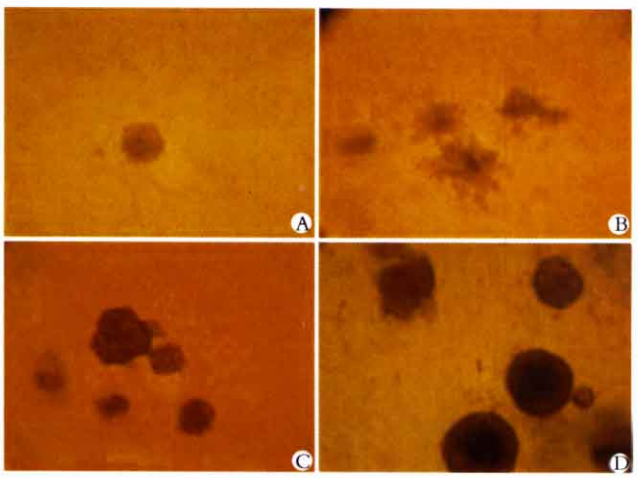
2 结果

2.1 rho⁻细胞制备

人肺癌95C和95D细胞系在含50 ng/ml溴化乙锭DMEM培养基中培养28 d后，采用有限稀释法克隆到rho⁻ 95C和rho⁻ 95D细胞，经PCR扩增和DNA测序证明mtDNA部分缺失。

2.2 软琼脂集落形成实验

rho⁻ 95C和rho⁻ 95D细胞软琼脂集落形成能力显著增强，无论是集落形成的数量还是集落大小方面，与其母本细胞系相比，都有非常显著性差异($P<0.01$)(图1、表1)。



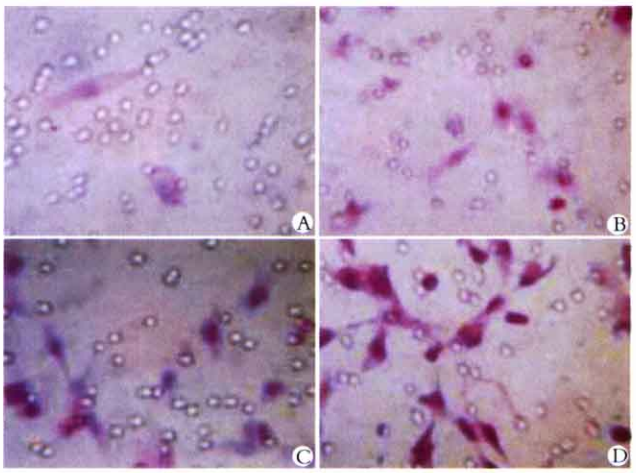
A：95C；B：rho⁻ 95C；C：95D；D：rho⁻ 95D

图1 软琼脂集落形成实验 (LM×40)

Fig 1 Agarose colony formation assays (LM×40)

2.3 Transwell细胞侵袭实验

rho⁻ 95C和rho⁻ 95D细胞系侵袭能力显著增强，穿膜细胞数量明显增加。较之于其母本细胞系，相互间差异非常显著($P<0.01$)(图2，表1)。



A：95C；B：rho⁻ 95C；C：95D；D：rho⁻ 95D

图2 Transwell侵袭实验 (HE ×200)

Fig 2 Transwell invasion test (HE ×200)

表1 mtDNA损伤对人肺癌细胞生长和侵袭的影响

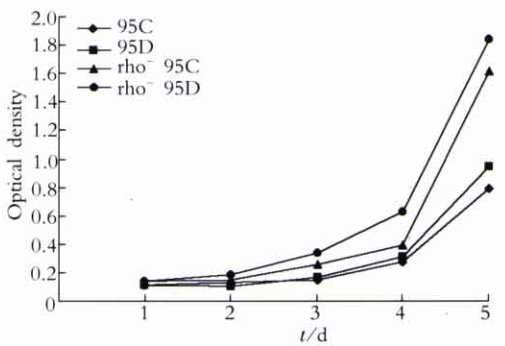
Tab 1 mtDNA deletion on the growth and invasion of human lung cancer cells

Cell lines	Agarose colony formation assays	Transwell invasion test
95C	1	1
rho⁻ 95C	6△	8△
95D	5	7
rho⁻ 95D	9**	11*

△：$P<0.05$，*vs* 95C；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* 95D

2.4 细胞生长速率

生长曲线显示，rho⁻ 95C和rho⁻ 95D细胞生长速度快于其母本细胞系，相互间差异非常显著($P<0.01$)(图3)。



rho⁻ cells showed faster growth rate than their respective parental cell lines. 95C *vs* rho⁻ 95C, and 95D *vs* rho⁻ 95D, $P<0.01$

图3 细胞生长状态曲线

Fig 3 Cell growth curves determined by MTT

3 讨论

线粒体参与了细胞内诸多功能的实现[6]。在本研究中，我们应用肺癌转移模型细胞系研究线粒体损

伤与肿瘤细胞恶性表型的关系。结果显示，rho⁻肿瘤细胞生长速度加快、集落形成能力和侵袭能力显著增强。突变 mtDNA 存在复制优势，而含有 mtDNA 突变，或者肿瘤源性特征 mtDNA 突变的细胞有着增生的优势，rho⁻细胞有着增生和形成肿瘤的能力[7]。任何导致细胞内氧化磷酸化降低的事件都为转化或者肿瘤细胞提供增生优势[8]。在肾癌从低侵袭到高侵袭细胞线粒体损伤的程度逐渐增加，并与氧化磷酸化容量的减低一致。

线粒体损伤影响肿瘤细胞表型的机制尚不明了，细胞内钙信号可能在细胞增生过程中起中心作用[9]。mtDNA 部分缺失（遗传应激）或者给予线粒体特异的抑制剂（代谢应激）可能引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加。Diazoxide 可以抑制线粒体控制的 CRAC I（Ca^{2+} releasing activated Ca^{2+} channel I），减少 Ca^{2+} 内流。去除细胞外的 Ca^{2+} 或者给予 Tryphostin A9（CRAC I 抑制剂）可以模拟 Diazoxide 的抗细胞增生作用。编码呼吸链酶亚单位的线粒体基因组的缺失可以减弱 Diazoxide 抑制 Ca^{2+} 内流和抗细胞增生的效应。此外，线粒体损伤可能与涉及信号转导、细胞架构、代谢、细胞增生和分化以及凋亡的核基因的异常表达有关。这些基因介导了线粒体与细胞核的对话[10]。mtDNA 缺失可以诱导 rho 0 细胞表达转录因子 TFIIH、v-maf、AML1，而另外一些核基因则表达下降，它们包括磷脂酶 C、agouti 相关蛋白、PKCγ、蛋白酪氨酸磷酸化酶 C、磷酸二酯酶 1A、PIBF1、细胞色素 p450、细胞周期素依赖激酶抑制基因 p19 以及 GAP43 等。肿瘤特异标志物组织蛋白酶 L、转化生长因子 β 在线粒体遗传或代谢应激的细胞表达都增加。在线粒体应激条件下 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶 C 活化与组织蛋白酶 L 基因的表达有关。mtDNA 缺失导致细胞内糖酵解与糖异生途径相关酶表达增多，并激活 Ca^{2+} 依赖的 MAP 激酶（ERK1、ERK2）和 calcineurin；抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X(L) 水平上升，而促凋亡蛋白 Bid 和 Bax 水平则下降[11,12]。

参考文献：

[1] 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.

[2] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science, 1999, 283(5407): 1482 - 1488.

[3] Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Life Sci, 2001, 69(25-26): 2957 - 2964.

[4] King M P, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA[J]. Methods Enzymol, 1996, 264: 304 - 313.

[5] Diaz F, Bayona Bafaluy M P, Rana M, *et al*. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(21): 4626 - 4633.

[6] Coller H A, Khrapko K, Bodyak N D, *et al*. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection[J]. Nat Genet, 2001, 28(2): 147 - 150.

[7] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, *et al*. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(5): 759 - 768.

[8] Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, *et al*. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting[J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1010 - 1016.

[9] Delsite R, Kachhap S, Anbazhagan R, *et al*. Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2002, 1(1): 6.

[10] Amuthan G, Biswas G, Zhang S Y, *et al*. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion[J]. EMBO J, 2001, 20(8): 1910 - 1920.

[11] Amuthan G, Biswas G, Ananadatheerthavarada H K, *et al*. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells[J]. Oncogene, 2002, 21(51): 7839 - 7849.

[12] Schiemann S, Schwirzke M, Brunner N, *et al*. Molecular analysis of two mammary carcinoma cell lines at the transcriptional level as a model system for progression of breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 1998, 16(2): 129 - 139.

（编辑　薛国文）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每 3 位分 1 节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如 2,431 改为 2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部