论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2030-03

高低转移小鼠肝癌细胞线粒体DNA遗传变异的研究

戴纪刚[1],肖颖彬[1],闵家新[2],张国强[2],向明章[2],吴秋平[2],姚 珂[2],周人杰[2],余祖斌[2] (第三军医大学新桥医院:[1]心血管外科,[2]胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 检测和分析转移特性不同的两个小鼠肝癌细胞亚系线粒体DNA(mtDNA)的遗传变异,探讨线粒体DNA遗传改变与肿瘤发生发展的关系。**方法** PCR-RFLP和序列测定技术。**结果** 对mtDNA的tRNA$^{Ile+GlN+Met}$基因和ND3基因以及D-loop片段进行的扩增和限制性片段长度多态性分析结果显示,无扩增片段长度呈多态性,且这两个肝癌细胞系mtDNA的所有限制性片段方式和大小完全一致。序列测定发现,这两个肝癌细胞系在线粒体DNA的D-loop区存在序列差异。**结论** mtDNA非编码区内的遗传改变,反映了肿瘤发生发展过程中环境和遗传因素的影响,有可能与肿瘤细胞的恶性表型有关。

关键词:线粒体DNA;肝癌;肿瘤;变异

中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

Study on variations of mtDNA from high and low metastatic mouse hepatocarcinoma cell sublines

DAI Ji-gang[1], XIAO Ying-bin[1], MIN Jia-xin[2], ZHANG Guo-qiang[2], XIANG Ming-zhang[2], WU Qiu-ping[2], YAO Ke[2], ZHOU Ren-jie[2], YU Zu-bin[2] ([1]Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, [2]Deparement of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the variations of mtDNA from high and low metastatic mouse hepatocarcinoma cell sublines Hca-F and Hca-P, and 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 Hca-F and Hca-P cells were analyzed by PCR-RFLP and sequencing techniques. **Results** No amplification fragment length polymorphism and restriction fragment length polymorphism were observed in tRNA$^{Met+Glu+Ile}$, ND3 and D-loop of mtDNA from the 2 cell sublines. Sequence difference between these 2 cell sublines were found in mtDNA D-loop region by sequencing. **Conclusions** Genetic alteration of mtDNA non-coding region in tumors, which may reflect the environmental and genetic influences operative during tumor progression, can be linked to their tumorigenic phenotype.

Key words: mitochondrial DNA; hepatocarcinoma; tumor; variation

线粒体与癌发病关系的研究可追溯到70年以前,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,Clayton等[1]首先证实了糖的有氧代谢减弱而无氧酵解明显增强是肿瘤细胞的一个共同特点。此后,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。目前认为线粒体DNA突变在以氧化磷酸化减弱、无氧酵解增强为特点的肿瘤细胞代谢改变中起积极作用[2,3]。线粒体DNA突变目前已在各种肿瘤及肿瘤细胞株中发现。然而,迄今为止还缺乏mtDNA突变与肿瘤发生及其生物学特性直接相关的有力证据[4]。目前的研究也仅主要集中在检测和分析mtDNA与肿瘤相关的损伤和突变上。Hca-F、Hca-P是来源于同一母细胞系但具有不同转移特性的2个小鼠肝癌细胞亚系。Hca-F具有高转移能力,而Hca-P与之相反。为探讨线粒体DNA突变和肿瘤恶性表型间的关系,我们利用PCR结合限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和直接测序等方法对Hca-F、Hca-P肝癌细胞的mtDNA遗传多样性进行了分析。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900173);重庆市自然科学基金资助项目(2005)
Supported by the National Science Foundation of China (39900173) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005)

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40余篇。电话:(023)68774616
通讯作者:闵家新,电话:(023)68774616

收稿日期:2005-10-25;**修回日期**:2005-12-15

1　材料与方法

1.1　材料

限制性内切酶 *Hae* Ⅲ、*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；Hca-F 、Hca-P 小鼠肝癌细胞亚系由大连医学院林茂英教授惠赠。其他生化试剂系国产分析纯。

1.2　mtDNA 的提取

核质分离法提取上述鼠肿瘤细胞 mtDNA[5]。

1.3　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(表 1)。建立 100 μl 反应体系，内含 0.5 μg mtDNA，0.5 μmol/L 引物，2.5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP。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。

1.4　线粒体 DNA D-loop、$tRNA^{Met+Glu+Ile}$、ND_3 基因片段 PCR-RFLP 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)酶切片段为分子质量标准，利用电泳迁移率与分子质量对数间的线性关系，测得各酶切片段分子质量。

1.5　PCR 产物序列测定

长度为 437 bp 的 mtDNA D-loop 3′端 PCR 扩增片段纯化后，送上海基因技术有限公司测序。测序引物同前。

表 1　引物名称及序列

扩增片段	长度(bp)	位置	引物序列
D-loop	1 100	L 链(15294-15320)	5′-ATAAACATTACTCTGCTCTTGTAAACC-3′
		H 链(98-72)	5′-ATTAATAAGGCCAGGACCAAACCT-3′
$tRNA^{Met+Glu+Ile}$	1 126	L 链(3401-3419)	5′-CGGCCCATTCGCGTTATTC-3′
		H 链(4527-4508)	5′-AGGTTGAGTAGAGTGAGGGA-3′
ND3 片段	534	L 链(9364-9385)	5′-ACGTCTCCATTTATTGATGAGG-3′
		H 链(9897-9876)	5′-GAGGTTGAAGAAGGTAGATGGC-3′
D-loop 3′	437	L 链(15950-15958)	5′-AGGCATGAAAGGACAGCAC-3′
		H 链(91-73)	5′-ATAAGGCCAGGACCAAACC-3′

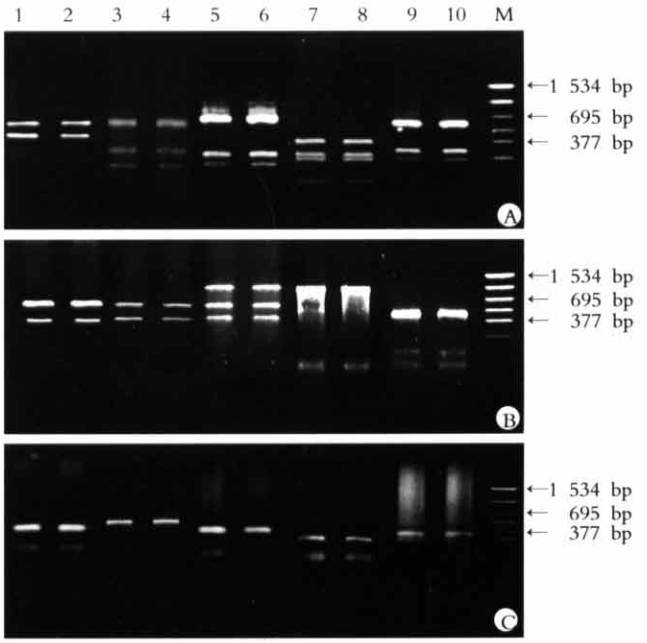
2　结果

2.1　PCR 扩增结果

肿瘤细胞系 Hca-P、Hca-F 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 基因片段限制性片段长度多态性分析结果

肿瘤细胞系 Hca-P 、Hca-F 的线粒体 DNA 核酸片段 ND3、$tRNA^{Ile+GlN+Met}$和 D-loop 分别经 *Hae* Ⅲ、*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等 12 种限制性内切酶完全酶解。结果显示：Hca-P 和 Hca-F 肿瘤细胞系线粒体 DNA 核酸片段的所有内切酶酶切格局及酶切片段大小与完全相同，在 41 个限制性内切酶酶切位点上均无差别，见图 1。



A：$tRNA^{Met+Glu+Ile}$片段分别被内切酶 *Apa* Ⅰ，*Alu* Ⅰ，*Bam*H Ⅰ，*Rsa* Ⅰ和 *Stu* Ⅰ酶切；B：D-Loop 片段分别被内切酶 *Xba* Ⅰ，*Apa* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ，*Stu* Ⅰ和 *Alu* Ⅰ酶切；C：ND3 片段分别被内切酶 *Hae* Ⅲ，*Dra* Ⅰ，*Stu* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ和 *Alu* Ⅰ酶切。1，3，5，7，9：Hca-F；2，4，6，8，10：Hca-P；M：PCR 标准标记

图 1　扩增片段的酶切结果

2.3　D-loop 3′端 序列测定结果

为进一步分析这两个肿瘤细胞亚系间 mtDNA 的遗传差异，我们对线粒体 DNA 的高变异区——D-loop 的 3′端进行了序列测定。结果显示，与小鼠线粒体 DNA Bibb 全序相比，出现了 3 个突变序列：发生于第 16 007 位核苷酸的 G：C→A：T 的置换突变在两种肿瘤中均被检测到，第 16 268 位核苷酸 T：A→C：G 的突变只存在于 Hca-F 肿瘤中。而线粒体 DNA 中常见的缺失、插入、及微卫星不稳定性等突变类型在这两个肿瘤细胞株中均未发现。

3　讨论

癌变是细胞内遗传物质受环境因素作用发生改变不断积累的结果，是一个多因素多步骤过程。真核细胞除了核基因组外，还存在核外基因组，即线粒体 DNA。mtDNA 突变与肿瘤的关系一直受到广泛的关注，目前已在人肝癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、肺癌、膀胱癌及乳腺癌等几乎所有肿瘤及肿瘤细胞株中发现有 mtDNA 的突变[4,6-10]，而且有不少为同质性突变。报道的 mtDNA 序列改变包括，发生于编码区及非

编码区内的各种点突变、片段缺失、重复或插入突变及微卫星不稳定性等。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 片段缺失突变热点区域的 tRNA $^{Ile+GIN+Met}$ 基因和 ND3 基因片段以及 mtDNA 的控制区进行了扩增和限制性片段长度多态性分析。研究表明，无扩增片段长度多态性，且这两个肝癌细胞系 mtDNA 的所有限制性片段方式和大小完全一致。结果表明，这两个肿瘤细胞系 mtDNA 结构具有相当的稳定性。Lee[11] 和 Kotake 等[12] 在肿瘤患者癌组织和正常组织细胞中发现有较高频率的、多样的 mtDNA 片段缺失突变的发生。与之相比，我们在肿瘤细胞系中未发现 mtDNA 大片段缺失突变。推测其原因，可能是肿瘤细胞系在长期、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清除。其次，片段缺失突变在肿瘤细胞中的积累，会削弱线粒体呼吸功能和降低 ATP 合成，而导致那些含有高比例缺失突变的细胞不能存活而被淘汰。因此我们认为，mtDNA 大片段缺失突变，在肿瘤的发生发展过程中不太可能起重要的作用，而仅仅是正常老化过程中细胞内氧化压力及环境因素所致的 DNA 损伤长期积累的结果。

线粒体 DNA 的控制区（control region，D-loop），即非编码区，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。同时，它也是线粒体基因组和核基因组信息交换的枢纽。其区域内含有 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）、重链复制起始点（original of heavy strand，OH）、线粒体转录调控因子结合位点（mtTF1）和保守序列区等结构。非编码区内的点突变和遗传不稳定性可能会涉及到线粒体 DNA 结构、功能的稳定和其基因的表达，甚至有可能与疾病的发展进程直接相关。本实验结果显示这两个转移特性不同的肝癌细胞亚系在线粒体 DNA D-loop 区存在着序列差异。发生于第 16 007 位核苷酸的 G: C→A: T 的置换突变在两种肿瘤中均被检测到，第 16 268 位核苷酸 T: A→C: G 的突变只存在于 Hca-F 肿瘤中。线粒体 DNA 的遗传改变，特别是发生在线粒体 DNA 控制区关键位点或相邻区域内的点突变，它们在细胞癌变中的地位和作用，目前还知之甚少。有学者认为，线粒体 DNA 突变的频率和类型是肿瘤发生发展过程中环境和遗传因素作用的反映，控制区的序列改变可能会促进基因编码区内与疾病相关的突变的发生[13]。一些研究表明，线粒体 DNA（包括编码区和非编码区）突变的频率与肿瘤的致瘤性之间明显的相关性[14,15]。因此，我们认为，mtDNA 非编码区内的遗传改变有可能与肿瘤细胞的恶性表型有关，至于其分子机制及生物学意义尚有待于进一步探讨。

参考文献：

[1] CLAYTON D A, VINOGRAD J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes[J]. J Pers, 1967, 35(4): 652 - 657.

[2] 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.

[3] YEH J J, LUNETTA K L, VAN-ORSOUW N J, *et al*. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours[J]. Oncogene, 2000, 19(16): 2060 - 2066.

[4] 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.

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

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

[7] HAN C B, LI F, ZHAO Y J, *et al*. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 1 2S rRNA-tRNA(phe) and gastric carcinomas[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(9): 1925 - 1929.

[8] LUCIAKOVA K, KUZELA S. Increased steady-state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondria[J]. Eur J Biochem, 1992, 205(3):1187 - 1193.

[9] TAMURA G, NISHIZUKA S, MAESAWA C, *et al*. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(2): 316 - 319.

[10] 戴纪刚，闵家新，张国强，等. 小鼠肿瘤线粒体 DNA 突变研究[J]. 中华病理学杂志，2004，33(5)：458 - 461.

[11] 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.

[12] 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.

[13] MARCHINGTON D R, POULTON J, SELLAR A, *et al*. Do sequence variants in the major non-coding region of the mitochondrial genome influence mitochondrial mutations associated with disease?[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(4): 473 - 479.

[14] LOEB L A. A mutator phenotype in cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3230 - 3239.

[15] PENTA J S, JOHNSON F M, WACHSMAN J T, *et al*. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Mutat Res, 2001, 488(2): 119 - 133.

（编辑 陈聪连）