文章编号:1000-5404(2006)21-2123-04

论著

非小细胞肺癌线粒体基因组大片段缺失突变研究

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 明确mtDNA 4 977 bp大片段缺失在肺癌组织、癌旁正常组织及非癌患者肺组织中的分布频率,探讨mtDNA 4 977 bp大片段缺失与肿瘤的关系。**方法** 采用长距离PCR方法对37例肺癌组织和相应的癌旁正常组织、20例非癌患者正常肺组织mtDNA 4 977 bp缺失进行了检测。**结果** 肺癌组织、癌旁正常肺组织及非癌患者正常肺组织中均检测出存在有线粒体DNA 4 977 bp片段缺失。37例肺癌组织标本中有20例(54.1%)检测到4 977 bp缺失,37例相应的癌旁肺组织22例(59.5%)有缺失,其中8例在肺癌组织中未显示而却在癌旁正常组织检测到缺失,20例非癌患者正常肺组织中也有6例出现4 977 bp片段缺失。线粒体DNA 4 977 bp缺失与年龄、吸烟因素有关。**结论** 线粒体DNA 4 977 bp缺失并非肺癌特异性突变,在癌变过程中不太可能起重要的作用,而可能仅仅是肿瘤发生发展过程中环境和遗传因素作用的反映。

关键词: 线粒体DNA;肺癌;缺失;突变
中图法分类号: R394.2; R730.23; R734.2 **文献标识码:** A

Study on 4 977 bp deletion mutation of mitochondrial DNA in non-small lung cancer

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 Cardiovascular Surgery, [2]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the 4 977 bp deletion of mitochondrial DNA in lung cancer, paraneoplastic tissue and normal lung tissue from non-lung cancer subjects and its significance in the development of cancer. **Methods** Lung cancer tissues and paraneoplastic tissues from 37 non-small lung cancer patients, and normal lung tissues from 20 patients without lung cancer were analyzed by long PCR technique. **Results** Mitochondrial DNA 4 977 bp deletion was detected in 54.1% (20/37) of lung cancer tissues, 59.5% (22/37) of paraneoplastic tissues and 30.0% (6/30) of normal lung tissues. The correlation between 4 977 bp deletion and age, smoking was present in our data. **Conclusion** Mitochondrial DNA 4 977 bp deletion, which may reflect the environmental and genetic influences during tumor progression, is not specific to lung cancer and unlikely to play an important role in carcinogenesis.

Key words: mitochondrial DNA; lung cancer; deletion; mutation

线粒体是真核细胞的重要细胞器,它含有自己的基因组,且能够复制、转录和翻译。作为细胞的"动力工厂",它在细胞的能量代谢和氧自由基生成过程中扮演重要角色。随着对线粒体在细胞凋亡和诱发细胞癌变等肿瘤生物学过程中所起作用的进一步了解[1,2],线粒体DNA突变成为肿瘤研究的热点之一。线粒体DNA突变目前已在各种肿瘤及肿瘤细胞株中发现。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[3-5]。MtDNA 4 977 bp大片段缺失是最常见的一种片段缺失突变。为探讨线粒体DNA 4 977 bp大片段缺失和肿瘤间的相关性,我们检测了mtDNA 4 977 bp大片段缺失在肺癌组织、癌旁正

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 Natural 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: 肖颖彬,E-mail: daijigang@vip.sina.com
收稿日期: 2005-10-25;**修回日期:** 2005-12-15

常组织及非癌患者肺组织的分布频率，并分析了缺失与患者年龄、吸烟因素、肺癌组织病理类型等的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料

37例肺癌组织和癌旁肺组织标本均取自第三军医大学新桥医院2003－2004年外科手术患者，均经病理确诊。癌旁肺组织标本为同一患者病灶远端5 cm以上的正常肺组织，组织学证实没有肺癌细胞。男性28例，女性9例，吸烟者15例（每天吸烟10支以上且吸烟时间超过1年），不吸烟者22例（其中包括曾经吸烟现戒烟1年以上者9例）。患者年龄30～75岁，中位年龄为55岁。组织学分型：鳞癌23例，腺癌14例。20例正常肺组织标本取自第三军医大学新桥医院2003－2004年良性疾病肺外科手术患者，其中男性13例，女性7例，吸烟者9例，不吸烟者11例（其中包括曾经吸烟现戒烟1年以上者4例）。患者年龄25～70岁。

1.2 组织基因组DNA提取

采用酚、氯仿、异戊醇抽提法提取基因组DNA。所得DNA溶于TE溶液，紫外分光光度计进行定量，－20 ℃保存备用。

1.3 线粒体DNA长距离PCR扩增

为验证所提取的总DNA质量能满足长距离PCR扩增的需要，我们在很少发生缺失突变的线粒体DNA保守区域设计了1对引物（P1/P2），序列如下：P1，5′-AACATACCCATGGCCAACCTCCTAC-3′（nt3304～nt3328）；P2，5′-AGTTAGCTTTACAGTGGGCTCTAGA-3′（nt8310～nt8286），待扩增mtDNA片段长度为5 006 bp。检测线粒体DNA 4 977 bp缺失突变的存在情况所用引物对（P3/P4）。引物序列如下：P3，5′-TACTCCTTACACTATTCCTCATCAC-3′（nt8412～nt8436）；P4，5′-GGGGAAGCGAGGTTGACCTGTTAGG-3′（ntl3650～ntl3626）。预期扩增mtDNA片段长度为5 238 bp，若存在线粒体DNA 4 977 bp缺失突变，将扩增出长为261 bp的核酸片段。

PCR扩增采用TaKaRa LA PCR kit Ver. 2.1扩增试剂盒。PCR反应体系为50 μl，终浓度为：TaKaRa LA *Taq*酶2 U，$MgCl_2$ 2.5 mmol/L，dNTP各250 μmol/L，引物各0.5 μmol/L，模板DNA约200 ng。反应条件：94 ℃预变性3 min，其余30个循环94 ℃ 30 s、62 ℃ 30 s、68 ℃ 10 min，最后72 ℃延伸10 min。

PCR产物5 μl于加有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶中电泳，电泳缓冲液为1×TAE，电压60 V。凝胶在凝胶成像仪上观察，摄片。

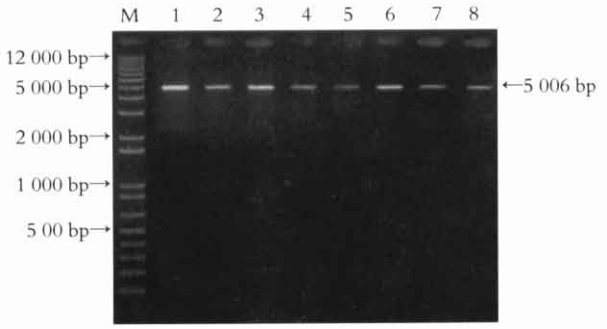
1.4 统计学方法

实验数据使用SPSS 10.0统计学分析软件进行Fisher精确概率检验。

2 结果

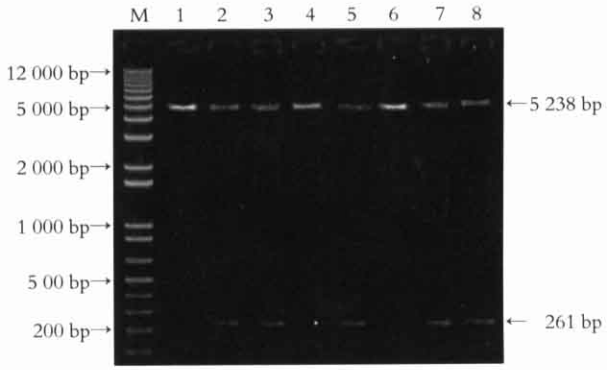
2.1 肺癌组织、癌旁正常肺组织及正常肺组织mtDNA 4 977 bp缺失率

所有组织样本中提取的总DNA应用引物对P1/P2可扩增出线粒体DNA保守片段的5 006 bp产物（图1），说明所提取的线粒体DNA模板质量良好，长距离PCR扩增方法可靠。存在有4 977 bp缺失的标本使用引物对P3/P4可同时扩增出5 238 bp产物和261bp产物（图2），这说明4 977 bp缺失为异质性，即组织细胞中同时存在有野生型和突变型mtDNA分子。而无缺失突变的组织样本只能扩增出长达5 238 bp的野生型线粒体核酸片段（图2）。



1－8：组织样本；M：1 kb DNA标准

图1 PCR检测线粒体保守片段



T：肺癌组织；N：癌旁正常组织；M：1 kb DNA标准

图2 线粒体DNA 4 977 bp缺失的检测

在肺癌组织、癌旁正常肺组织及非癌患者正常肺组织中均检测出线粒体DNA 4 977 bp片段缺失。37例肺癌组织标本中有20例（54.1%）检测到4 977 bp缺失，37例相应的癌旁肺组织22例（59.5%）有缺失。其中14例是肺癌组织和癌旁正常组织均有缺失，8例在肺癌组织中未发现而在癌旁正常组织检测到缺失。20例非癌患者正常肺组织中也有6例出现4 977 bp片段缺失（表1）。

表1 肺癌组织、癌旁正常组织及正常肺组织mtDNA 4 977 bp缺失率和年龄的关系

年龄（岁）	肺癌			癌旁正常组织			正常肺组织		
	+	－	+（%）	+	－	+（%）	+	－	+（%）
≥55	14	5	73.7	15	4	78.9	5	4	55.6
<55	6	12	33.3[a]	7	11	38.9[a]	1	10	9.1[a]
合计	20	17	54.1	22	15	59.5	6	14	30.0

+：$mtDNA^{4977}$缺失；－：无缺失，+（%）：$mtDNA^{4977}$缺失发生率；a：$P<0.01$，与≥55岁比较

2.2　线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率和年龄的关系

肺癌组织、癌旁正常组织及非癌患者正常肺组织的 mtDNA 4 977 bp 缺失率有随年龄增大而增高的趋势，其中以 65 岁以上年龄段癌旁正常组织缺失率最高（缺失率为 88.9%）。以 55 岁为界，将组织样本分为高年龄组和低年龄组。高年龄组 4 977 bp缺失率显著高于低年龄组（$P < 0.01$）（表 1）。

2.3　线粒体 DNA 4 977 bp 缺失率和吸烟因素的关系

肺癌组织和非癌患者正常肺组织样本 mtDNA 4 977 bp 缺失率和吸烟有密切的关系，吸烟和不吸烟之间缺失发生率有显著差异（$P < 0.01$），曾经吸烟和不吸烟之间缺失发生率有显著差异（$P < 0.01$），而吸烟和曾经吸烟之间缺失发生率无明显差异（$P > 0.05$），见表 2。

表 2　肺癌组织、非癌患者正常肺组织 mtDNA 4 977 bp 缺失率和吸烟因素的关系

类别	肺癌			正常肺组织			合计			P 值
	+	−	+(%)	+	−	+(%)	+	−	+(%)	
吸烟者	11	4	73.3[a]	4	5	44.4[a]	15	9	62.5	0.002
曾经吸烟者	6	3	66.7[a]	2	2	50.0[a]	8	5	61.5	0.009
非吸烟者	3	10	23.1	0	7	0	3	17	15.0	0.009

+：△mtDNA^{4977} 缺失；−：无缺失；+(%)：△mtDNA^{4977} 缺失发生率；a：$P < 0.01$，与非吸烟者比较

2.4　线粒体 DNA 4 977 bp 缺失和肺癌组织学类型的相关性分析

检测到 4 977 bp 缺失的 20 例肺癌组织标本中，其中鳞癌 16 例（16/23），腺癌 4 例（4/14）。经 Fisher 精确概率检验，鳞癌和腺癌之间 mtDNA 4 977 bp 缺失发生率有显著差异（$P < 0.05$）。

3　讨论

线粒体 DNA 4 977 bp 缺失是最为常见的一种缺失突变（即 common deletion）。它位于 mtDNA 序列 8 470 ~ 13 477 之间，4 977 bp 缺失区的两端为 13 个碱基的重复序列，即8 470 ~ 8 484 和 13 447 ~ 13 459。缺失的 mtDNA 区域含有 5 个 tRNA 基因，7 个编码复合体Ⅰ、复合体Ⅳ及细胞色素 c 氧化酶亚单位的基因。这种缺失已经引起人们的广泛兴趣，因为它已被认为是引起 Pearson 综合征、小儿多系统紊乱、KSS 综合征、慢性进行性眼外肌麻痹（CEPO）的原因[6]。此外，还认为这种缺失在老化过程中会引起神经肌肉功能失调，是一个机体老年化的分子生物学标志。滑行错配（slipped-strand misparing，SSM）、氧化物损伤和有限的自我修复能力可能是导致 mtDNA 4 977 bp 缺失发生的的原因。错配的关键位点在缺失两侧的直接重复序列。当 mtDNA 受到氧化物损伤或亲电子基团攻击时，mtDNA 链断裂，在修复延伸过程中这种直接重复序列可能发生错误结合，而形成片段缺失的线粒体 DNA 分子。

线粒体 DNA 突变的积聚目前被证明和人类的老化和代谢性疾病密切相关。吸烟、空气污染及紫外线等一些环境因素能增加线粒体 DNA 突变的形成和积累。一般来说，人类组织中 mtDNA 缺失或点突变的频率取决于组织自身的核分裂能力和各种内源及外源性氧化损伤的程度。生长缓慢的组织 mtDNA 缺失发生率通常远高于那些分裂增生活跃的组织[7]。Cortopassi 等[8]运用 PCR 方法，在正常老年人群的脑和肌肉组织中发现 mtDNA 4 977 bp 缺失，但在婴儿中未发现这种缺失，而且这种缺失随着年龄增加而增加，尤其是在永生性细胞，如肌肉和脑细胞。许多研究亦表明，吸烟等外源因素产生的 ROS、自由基可加重老化进程中 mtDNA 缺失的发生。香烟产生的烟雾中含有包括高浓度自由基在内的 3 800 余种化学物质，这些化学物质能攻击各种细胞组分和削弱肺组织细胞的生物化学功能。自由基还能导致类脂生物膜的过氧化反应和 DNA 的损伤。Ballinger 等[9]采用定量长距离 PCR 方法对健康人群中吸烟和不吸烟者的支气管肺泡灌洗组织 mtDNA 损伤的程度和缺失频率进行了检测。结果显示，吸烟者 mtDNA 的损伤程度和 4.9 kb mtDNA 缺失率，分别为不吸烟者的 5.6 和 7 倍。在本研究中，我们采用长距离 PCR 方法对 37 例肺癌组织、37 例相应的癌旁肺组织和 20 例正常肺组织 mtDNA 4 977 bp 片段缺失进行了检测，发现肺癌组织、癌旁正常组织及正常肺组织的 mtDNA 4 977 bp 缺失率均有随年龄增大而增高的趋势，mtDNA 4 977 bp 缺失的发生频率和吸烟因素亦密切相关。这些研究资料表明，环境和遗传因素在 mtDNA 缺失突变的积累过程中起重要作用。

癌变是一个包括遗传改变不断积累在内的多因素多步骤过程。线粒体 DNA 是致癌物作用的重要靶点，线粒体 DNA 突变目前已在胃癌、肺癌、食道癌、结肠癌和白血病等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现。越来越多的资料表明，线粒体 DNA 突变和癌变及肿瘤的致瘤性之间有密切的关系[10,11]。Shidara 等[12]通过转线粒体杂交技术，将含有致病性点突变的 mtDNA 转入 HeLa 细胞系。细胞培养和裸鼠接种结果表明，含有致病性点突变的 HeLa 胞质杂合体其呼吸功能降低而生长能力显著增强。有关 mtDNA 4 977 bp 缺失突变在细胞癌变中的作用及其生物学意义目前还不清楚。Zhu 等[13]对乳腺癌的研究中发现，mtDNA 4 977 bp 缺失率

在癌组织和相邻正常组织中分别为46%和33%。沈慧等[14]检测了13例胃癌细胞系、52例胃癌及相应正常组织mtDNA 4 977 bp缺失，缺失率分别为92.3%、73.1%和52%，认为mtDNA 4 977 bp大片段缺失可能在胃癌发生过程中起重要作用。我们在肺癌组织、癌旁正常肺组织及非癌患者正常肺组织中均检测出存在有线粒体DNA 4 977 bp片段缺失。肺癌组织4 977 bp片段缺失率略低于癌旁正常肺组织。其中14例是肺癌组织和癌旁正常组织均有缺失，8例在肺癌组织中未显示而却在癌旁正常组织检测到缺失。这说明，线粒体DNA 4 977 bp片段缺失并不是肿瘤特异性突变，却与年龄、吸烟等因素密切相关。至于本组资料中出现的4 977 bp片段缺失率与肺癌病理分型的相关性，我们认为是吸烟因素的作用。肺鳞癌多发于男性、与吸烟关系密切的组织学类型特点可能是4 977 bp片段缺失率鳞癌高于腺癌的原因（本组病例鳞状细胞癌23例，其中吸烟或曾经吸烟者18例）。

线粒体DNA 4 977 bp缺失影响构成线粒体呼吸链的7个多肽（ATP酶亚单位6和8、细胞色素氧化酶Ⅲ和NADH亚单位ND3、ND4、ND4L、和ND5）的编码基因和线粒体蛋白质合成必须的22个tRNA中的5个，进而影响呼吸链的完整性，导致生物能学缺陷。线粒体DNA 4 977 bp缺失为异质性突变（即突变型和野生型mtDNA存在同一细胞中），当细胞中发生4 977 bp缺失的mtDNA分子的比例超过一定范围时，线粒体的跨膜电位、ATP合成、线粒体呼吸链中多种酶的合成及氧化磷酸化过程将受到严重影响，甚至造成呼吸链的中断，导致细胞死亡。Dani等[15]认为越是分裂增生活跃的组织能承受缺失mtDNA占总mtDNA数比例的阈值越低。这可能也是正常老年人群的脑和肌肉组织（永生性细胞）mtDNA缺失检出率通常高于那些分裂增生活跃的组织的原因。或许有人会认为：肿瘤细胞有很高的糖酵解能力，可完全不依赖氧化磷酸化而生存，4 977 bp缺失可能不会对肿瘤细胞造成有害的影响。但目前的研究表明：氧化磷酸化，和糖酵解一样，在肿瘤的生存和生长过程中起非常重要的作用。所以，那些含有较高比例缺失突变的肿瘤细胞可能会因线粒体呼吸功能和ATP合成能力的降低而容易被淘汰。许多研究者在肝癌、胃癌、结肠癌和口腔癌等多种肿瘤中发现的肿瘤组织4 977 bp缺失率远低于相应的正常组织的资料也支持这一结论。因此，我们认为，mtDNA大片段缺失突变，在癌变过程中不太可能起很重要的作用，而可能仅仅是肿瘤发生发展过程中环境和遗传因素作用的反映。

参考文献：

[1] 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.

[2] GREEN D R，REED J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science，1998，281(5381)：1309－1312.

[3] CAREW J S，HUANG P. Mitochondrial defects in cancer[J]. Mol Cancer，2002，1：9.

[4] FLISS M S，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.

[5] 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.

[6] HOLT I J，HARDING A E，COOPER J M，*et al*. Mitochondrial myopathies：clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA[J]. Ann Neurol，1989，26(6)：699－708.

[7] WEI Y H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging[J]. Proc Soc Exp Biol Med，1998，217 (1)：53－63.

[8] CORTOPASSI G A，ARNHEIM N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans [J]. Nucleic Acids Res，1990，18(23)：6927－6933.

[9] BALLINGER S W，BOUDER T G，DAVIS G S，*et al*. Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking[J]. Cancer Res，1996，56(24)：5692－5697.

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

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

[12] SHIDARA Y，YAMAGATA K，KANAMORI T，*et al*. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis[J]. Cancer Res，2005，65(5)：1655－1663.

[13] ZHU W，QIN W，SAUTER E R. Large-scale mitochondrial DNA deletion mutations and nuclear genome instability in human breast cancer [J]. Cancer Detect Prev，2004，28(2)：119－126.

[14] 沈 慧，赵 敏，董 彬，等. 胃癌细胞系和胃癌组织中线粒体DNA 4977 bp缺失及其生物学意义[J]. 中华医学杂志，2003，83(17)：1484－1489.

[15] DANI S U，DANI M A，SIMPSON A J. The common mitochondrial DNA deletion deltamtDNA(4977)：shedding new light to the concept of a tumor suppressor mutation[J]. Med Hypotheses，2003，61(1)：60－63.

（编辑 栾 嘉）