文章编号:1000-5404(2007)10-0889-03

论著

肺鳞癌 mtDNA D-环序列微卫星不稳的研究

刘丽红,胡义德,钱海洪,钱 频,张国强 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 分析肺鳞癌患者癌组织线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)非编码D-环区序列的微卫星不稳(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI)现象并探讨其意义。**方法** 应用改良一步法制备15例肺鳞癌患者癌组织mtDNA, PCR产物直接测序,对比分析D-环区序列mtMSI情况。**结果** 15例肺鳞癌患者癌组织mtDNA D-环区中,全部出现了mtMSI(100%),在3个不同位点上共发现30个mtMSI。**结论** 肺鳞癌患者mtMSI发生率高, D环区碱基序列的mtMSI可能与肿瘤的发生发展有关。

关键词: 肺鳞癌;线粒体DNA;D-环区;微卫星不稳
中图法分类号: R394.3;R730.261;R734.2 **文献标识码:** A

MSI mutation of mitochondrial DNA in lung squamous carcinoma

LIU Li-hong, HU Yi-de, QIAN Hai-hong, QIAN Pin, ZHANG Guo-qiang (Cancer Research Center Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To detect the microsatellite instability (MSI) of mitochondrial DNA (mtDNA) in lung squamous carcinoma and to investigate its significance in carcinogenesis. Methods Carcinoma tissues were obtained from 15 cases of lung squamous carcinoma patients and mtDNA was extracted by one-step method. D-loop fragments were amplified by PCR. mtMSI were determined by DNA sequencing. Results The mtMSI as detected in all of 15 lung squamous carcinoma patients. Thirty mtMSIs were found in 3 different nucleotide regions. Conclusion These results indicate that the frequency of mtMSI in lung squamous carcinoma patients is very high and mtMSI in D-Loop might play an important role in lung carcinogenesis.

Key words: lung squamous carcinoma; mitochondrial DNA; D-loop region; microsatellite instability

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是人体细胞核外的遗传物质,可以编码自身的rRNA、tRNA以及部分蛋白质,分成编码区和非编码区(D-环区)。目前研究证实,mtDNA突变与神经退行性疾病、心肌病、糖尿病及肿瘤等多种疾病密切相关[1]。细胞的基因组内含有大量碱基重复序列,一般将6~70 bp的串配重复序列称之为微卫星DNA。微卫星不稳(microsatellite instability, MSI)是指简单重复序列的增加或丢失。MSI是核基因组不稳(nuclear gene instability, NGI)中最常见的事件[2]。线粒体中也可以发生MSI现象称为mtMSI,mtMSI是Habano等[3]最先在结肠癌中发现的。近年来,越来越多的研究表明mtDNA突变和MSI与细胞癌变的发生、发展有关,但机制尚不完全清楚。本研究采用PCR产物直接测序的方法,对15例肺鳞癌患者癌组织mtDNA D-环区序列进行了分析,目的在于探讨mtMSI与肺鳞癌的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 取15例行手术切除的肺鳞癌患者的新鲜癌组织5 g。所有标本取自我院胸外科2003年行手术治疗的肺鳞癌患者。本组病例年龄29~74岁,平均56.57岁,其中男性13例,女性2例。

1.1.2 主要试剂和引物 高保真PCR试剂盒及PCR产物纯化试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司。自行设计

基金项目:国家自然科学基金(30080030)
Supported by the National Natural Sicence Foundation of China(30080030)
作者简介:刘丽红(1974-),女,河北省石家庄市人,硕士,主治医师,主要从事线粒体DNA与肿瘤关系方面的研究,现在石家庄市白求恩国际和平医院消化内科。电话:13931123495
通讯作者:胡义德,电话:(023)68755424,E-mail: liumingm@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-01-16;修回日期:2007-02-01

扩增包括 mtDNA 非编码 D-环区在内的 1 528 bp 片段的引物，序列为：5′-ATTCTAACCTGAATCGGAGG-3′ 和 5′-GATGCTTG-CATGTGTAATCT-3′，引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成，PAGE 纯化。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取 采用文献[4,5]的方法提取肺鳞癌组织的 mtDNA。

1.2.2 PCR 扩增及产物纯化、鉴定 用高保真 PCR 试剂盒扩增目的片段；PCR 反应总体积为 50 μl，置 PCR 基因扩增仪上扩增。循环条件：94 ℃预变性 5 min，然后进入循环，条件为 94℃变性 1 min，55 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1.5 min，35 个循环后于 72 ℃延伸 7 min 结束。经试剂盒纯化，PCR 产物于 -20 ℃保存。取 5μl PCR 产物，1% 琼脂糖凝胶电泳，35 min 后 Chemilmager™5500 型凝胶成像仪成像并拍照。

1.2.3 PCR 产物测序 以 1 528 bp PCR 产物核酸片段为测序模板，测序过程在 3730 型测序仪上进行，采用双脱氧四色荧光染料标记法自动测读序列。所得结果用 PhredPhrap 和 consed 软件进行序列分析和拼接。对存在 mtDNA 突变的区域重新进行 PCR 扩增和测序，进一步验证。

1.2.4 碱基突变的确定与突变率的计算 将测得的 15 例肺鳞癌患者的癌组织 mtDNA 序列与基因库 H. sapiens mitochondrial genome[V00662.1 GI:13003]版本的 mtDNA 序列相应区域进行比较，将癌组织 mtDNA 序列中 $(C)_n$ 或 $(CA)_n$ 重复个数与基因库标准序列中相应位置 $(C)_n$ 或 $(CA)_n$ 个数不同作为 MSI。

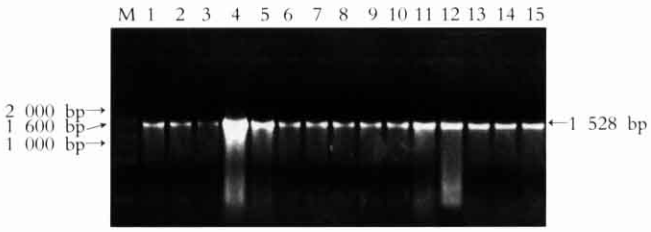
2 结果

2.1 PCR 扩增

结果显示，15 例肺鳞癌患者癌组织 mtDNA PCR 扩增产物均呈 1 528 bp 大小的清晰目的片段条带，由含 EB 的 1% 琼脂糖电泳验证，如图 1 所示。

2.2 PCR 扩增产物直接测序

测序结果显示，峰图清楚，目标区段可读率为 100%，未见杂峰。



M：标准；1－15：肺癌患者癌组织 mtDNA PCR 产物

图 1 部分肺鳞癌患者癌组织 mtDNA 模板 PCR 扩增产物电泳图

2.3 15 例肺鳞癌患者癌组织 mtDNA D-环区序列 mt-MSI 分析结果

15 例肺鳞癌患者癌组织 mtDNA D-环区序列分析显示，2 例患者的癌组织 mtDNA 在 16 189 位点 T 转换为 C，形成了多聚 C(poly C)；7 例患者在 514 核苷酸位点开始出现(CA)；15 例肺鳞癌患者在 310 区域发生 $(C)_{11\text{-}15}$（将 300 核苷酸位点与 316 核苷酸位点之间的区域称为 310 区域）。见表 1～3。

表 1 15 例肺鳞癌患者 310 区域及 514 区域 mtMSI 位点分析

病例号	MSI 位点	癌组织序列	基因库序列	MSI 位点	癌组织序列	基因库序列
1	310	C_{11}	C_{12}	-	-	-
2	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-
3	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-
4	310	C_{13}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
5	310	C_{14}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
6	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-
7	310	C_{15}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
8	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-
9	310	C_{13}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
10	310	C_{11}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
11	310	C_{13}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
12	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-
13	310	C_{14}	C_{12}	-	-	-
14	310	C_{13}	C_{12}	514	$(CA)_4$	$(CA)_5$
15	310	C_{13}	C_{12}	-	-	-

表 2 部分患者 301-314 核苷酸位点 MSI 序列

病例编号	样本来源	核苷酸位点(288-346)
		301 314
1	肺鳞癌组织	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
	基因库序列	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCC-GCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
2	肺鳞癌组织	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
	基因库序列	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCC-GCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
3	肺鳞癌组织	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
	基因库序列	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCC-GCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
4	肺鳞癌组织	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCCCGCTTCTGGCCACA GCACTTAAACACATCTCTG
	基因库序列	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCC-GCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
5	肺鳞癌组织	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG
	基因库序列	ATTTCCACCAAA CCCCCCCTCCCCC-GCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTG

表 3　15 例患者 16 189 核苷酸位点 MSI 序列

病例编号	样本来源	核苷酸位点(16 149 - 16 204)
		16189
6	肺鳞癌组织	ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAACCCCCCCCCCCCATGCTTACAAG
	基因库序列	ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCCTCCCCATGCTTACAAG
7	肺鳞癌组织	ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCCCCCCCCCATGCTTACAAG
	基因库序列	ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAA-CCCCCTCCCCATGCTTACAAG

3　讨论

随着对线粒体与肿瘤的关系的研究越来越深入，近年来人们开始注意 mtMSI 与肿瘤的发生发展的相互关系。目前认为，mtMSI 产生是由于复制时 mtDNA 链发生滑动错误导致重复修复所致，表现为微卫星简单重复序列的增加或丢失。广泛的 MSI 导致整个基因组不稳定，基因组随机突变率增高，有可能增加某些靶基因编码区中重复序列的突变率。目前已发现编码区微卫星改变能使基因发生移码突变产生截短蛋白，导致靶基因的失活；而非编码区微卫星现象致癌的机制尚不清楚。mtMSI 以 D 环区的$(CA)_n$和 Poly C 为最常见。已在食管癌、胃癌及肝癌的研究中显示 mtDNA D-环区微卫星$(C)_n$和$(CA)_n$呈现高度多态性，是 mtMSI 的好发部位，是研究肿瘤 mtMSI 的首选位点[6~8]。Poly C 有两种形式：一种是稳定型，在个体中它的长度是相同的(通常为 10 bp)；另一种是不稳定型，个体中可含有镶嵌型的多聚 C(8 ~ 14 bp)。

本实验结果显示，在 mtDNA 的 D-环区存在 3 个 mtMSI 区域：16 189 区域及 310 区域的 Poly C，514 区域的$(CA)_n$。文献报道已证实在 16 189 位点 T 转换为 C 形成 Poly C 的变异是糖尿病和心血管疾病的一个具有遗传倾向的因素，但在肿瘤发生发展中的报道很少，其机制也不清楚[9~11]。目前，在结肠癌及乳腺癌患者的癌细胞 mtDNA 中也发现了这种变异(44%)，而同一患者的正常细胞 mtDNA 中未见[12]。本实验结果表明了 2 例(13%)患者的癌组织 mtDNA 序列在 16 189 位点发生 T 转换为 C，形成 Poly C。结合文献资料，考虑 16 189 位点的这种变异有可能是原发肿瘤的一个早期改变[13~15]。在 15 例肺鳞癌患者的癌组织 mtDNA 非编码 D-环区序列中，均发现 310 区域$(C)_n$MSI 现象；514 核苷酸位点开始的$(CA)_n$MSI 有 7 例。由于 310 区域与 D-环的复制密切相关，故此区域 MSI 的发生可能会影响 mtDNA 的复制，导致大量的重复序列小片段产生，在线粒体膜及核膜受损时进入核内整合到核 DNA 中，从而诱发细胞的癌变。综上所述，我们认为 mtDNA 非编码 D-环区的 MSI 与肺鳞癌的发生发展有密切关系，其机制尚需深入研究证实。

参考文献：

[1] Simon D K, Johns D R. Mitochondrial disorders: clinical and genetic features [J]. Annu Rev Med, 1999, 50: 111 - 127.

[2] Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith J M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA[J]. Science, 1999, 286 (5449): 2524 - 2525.

[3] Habano W, Sugai T, Nakamura S I, *et al*. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma [J]. Gastroenterology, 2000, 118(5): 835 - 841.

[4] 贾立明，叶明福，刘丽红，等. 改良一步法制备人外周血白细胞线粒体 DNA[J]. 第三军医大学学报，2004，26(15)：1407 - 1409.

[5] 胡义德，钱桂生，陈维中，等. 人白细胞线粒体 DNA 的快速分离与鉴定[J]. 中华血液学杂志，1997，18(11)：605 - 606.

[6] Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, *et al*. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 228 - 231.

[7] Hiyama T, Tanaka S, Shima H, *et al*. Somatic mutation in mitochondrial DNA and nuclear microsatellite instability in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2003, 10(6): 1837 - 1841.

[8] Fang D C, Fang L, Wang R Q, *et al*. Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Chinese[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(3): 371 - 375.

[9] Kim J H, Park K S, Cho Y M, *et al*. The prevalence of the mitochondrial DNA 16189 variant in non-diabetic Korean adults and its association with higher fasting glucose and body mass index[J]. Diabet Med, 2002, 19(8): 681 - 684.

[10] Livesey K J, Wimhurst V L, Carter K, *et al*. The 16189 variant of mitochondrial DNA occurs more frequently in C282Y homozygotes with haemochromatosis than those without iron loading[J]. J Med Genet, 2004, 41(1): 6 - 10.

[11] Liou C W, Lin T K, Huang F M, *et al*. Association of the mitochondrial DNA 16189 T to C variant with lacunar cerebral infarction: evidence from a hospital-based case-control study[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1011: 317 - 324.

[12] Habano W, Sugai T, Yoshida T, *et al*. Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability[J]. Int J Cancer, 1999, 83 (1): 625 - 629.

[13] 刘丽红，胡义德. 线粒体 DNA HVR 区 I 序列突变与肺鳞癌关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：652 - 654.

[14] 赵高峰，僧靖静，刘文超，等. 化疗后肺鳞癌组织中的细胞胀亡和凋亡检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(6)：862 - 864.

[15] 张国俊，张　岚，高冬玲，等. 肺鳞癌患者癌组织和血液中微卫生 DNA 变异的检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2004，39(2)：188 - 191.

(编辑　陈聪连)