文章编号:1000-5404(2010)17-1891-03

短篇论著

肺癌组织中线粒体转录因子 A 的表达与线粒体 DNA 拷贝数变化的关系

戴纪刚[1],肖颖彬[2],闵家新[1],张国强[1],张在永[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:胸外科[1],全军心血管外科中心[2])

【摘要】 目的 探讨肺癌组织中线粒体转录因子 A 的表达与线粒体 DNA 拷贝数变化的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR 和 RT-PCR 方法,对肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的表达及其与线粒体 DNA 拷贝数变化的关系进行了检测和分析。结果 癌组织和癌旁正常组织 mtTFA mRNA 的表达量之间无明显差异($P = 0.221$)。线性回归分析结果表明,癌旁正常组织中,mtTFA mRNA 的表达量和线粒体 DNA 拷贝数之间有直接的相关性($r = 0.910$,$P < 0.01$);而在癌组织中,线粒体 DNA 拷贝数和 mtTFA mRNA 的表达水平无关($r = 0.135$,$P > 0.05$)。结论 mtDNA 转录、复制的核调节因子 mtTFA 的表达水平和肺癌线粒体 DNA 拷贝数之间无相关性。

【关键词】 线粒体 DNA;肺癌;微卫星不稳定性;拷贝数;含量;控制区;突变
【中图法分类号】 R734.2;R394.2;R730.23 **【文献标志码】** A

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,对缺氧条件的适应是肿瘤进一步发展非常关键的一步。在大多数实体性肿瘤中,这种能量代谢的改变和线粒体 DNA 拷贝数和氧化磷酸化相关酶活性的降低有着密切的联系。目前,已在肝癌、肾癌、结肠癌和乳腺癌等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现存在有线粒体 DNA 含量和线粒体酶活性的降低[1-3]。有关线粒体 DNA 转录和复制的具体机制目前尚不清楚,许多因素可能影响到线粒体 DNA 的拷贝数。线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, mtTFA)是由核基因编码的一种小分子多肽,是一种能够影响线粒体转录和复制的重要的调节因子。肺癌组织中,mtTFA 的表达有何改变,它与线粒体 DNA 拷贝数变化的有何关系目前尚少见文献报道。本研究采用实时荧光定量 PCR 和 RT-PCR 方法,对肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的表达及其与线粒体 DNA 拷贝数变化的关系进行了检测和分析。

1 资料与方法

1.1 病例资料

37 例肺癌组织和 37 例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,均经组织学诊断,证实其没有癌细胞。本组患者男性 28 例,女性 9 例,吸烟及曾经吸烟者 24 例(吸烟者:每天吸烟 10 支以上且吸烟时间超过 1 年,本组中包括曾经吸烟现戒烟 1 年以上者 9 例),不吸烟者 13 例。患者年龄 30 ~ 75 岁,中位年龄为 55 岁。组织学病理分型情况为:鳞状细胞癌 23 例,腺癌 14 例。

1.2 PCR 引物及 *Taq*Man 探针

所有引物由上海基康生物技术有限公司合成、标记。本实验中应用的荧光检测物质有 FAM (6-Carboxy-fluorescein) 和 TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamine),其中 FAM 作为报告基因(R reporter),标记在 *Taq*Man 探针的 5′端。TAMRA 作为熄灭基因(Q quencher),标记在 *Taq*Man 探针的 3′端。*Taq*Man 探针与目的基因的结合部位在 2 个引物之间。mtDNA D-loop HV1(Hipervariable region 1, HV1)上游引物:5′-TTGCACGGTACCATAAATACTTGAC-3′,下游引物:5′-GAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTG-3′,*Taq*Man 探针:5′-CTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAAT-3′,目标片段长度 128 bp。核 β-globin 基因上游引物:5′-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3′,下游引物:5′-CAACTTCATCCACGTTCACC-3′,*Taq*Man 探针:5′-CTCCTGAGGAGAAGTCTGCT-3′,片段长度 110 bp。mtTFA 上游引物:5′-GGAATGTGGAGCGTGCTAAAA-3′,下游引物:5′-TGCTGGAAAAACACTTCGGAATA-3′,片段长度 118 bp。β-actin 上游引物:5′-TTCGAGCAAGAGATGGCCA-3′,下游引物:5′-TACATGGTGGTGCCGCC-3′,片段长度 270 bp。

1.3 线粒体 mtDNA 拷贝数的精确定量

1.3.1 实时荧光定量 PCR 标准品的制备

1.3.1.1 HV1 和 β-globin 基因片段的 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μl,终浓度为:*Taq* 酶 2 U,$MgCl_2$ 2.5 mmol/L,dNTP 各 200 μmol/L,引物各 0.5 μmol/L,模板 DNA 约 100 ng。反应条件:94 ℃预变性 5 min,其余 40 个循环 94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.3.1.2 PCR 扩增产物的克隆 用 TaKaRa 公司的试剂盒对 PCR 样品进行纯化后,分别将 128 bp HV1 和 110 bp β-globin 扩增产物克隆至 PMD18-T 载体(TaKaRa 公司),筛选含有插入片段的载体,以 JM109 感受态细胞进行转化。用质粒提取试剂盒(QIAGEN 公司)提取质粒。

1.3.1.3 质粒的鉴定与测序 将部分所提取的质粒经过

【基金项目】 国家自然科学基金(39900173);重庆市自然科学基金(2009C195)
【通信作者】 张在永,E-mail:691057831@qq.com

PCR和序列测定进行鉴定,测序反应由上海基康生物技术有限公司完成。

1.3.1.4 质粒浓度测定及拷贝数换算 紫外分光光度计检测其$D(260)$值。质粒浓度(ng/μl) = $D(260)$ ×50 μg/ml ×稀释终体积(ml) ×1 000/稀释时加入的原始溶液体积(μl)。质粒拷贝数(Copies/μl) =质粒浓度(ng/μl) ×6.02 ×1 014/660 ×碱基数(载体的+插入片段的)。

1.3.1.5 标准品的梯度稀释 以无菌去离子水10倍比梯度稀释HV1和β-globin质粒分别获得浓度为10^3 ~10^7拷贝/μl的制备定量PCR标准曲线的模板。

1.3.2 实时荧光定量PCR检测

1.3.2.1 PCR反应 25 μl体系中含ABI *Taq*Man 1 ×PCR Master mix, 3.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTP,引物各0.5 μmol/L,荧光探针50 nmol/L,模板各2.0 μl。每次检测设置3个NTC(No Template Control)。每个样品进行3个平行样实验。

1.3.2.2 PCR反应条件 50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;然后95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,共50个循环。*Taq*Man PCR Core试剂盒、光学PCR管、7700型PCR仪均为PE公司产品。

1.3.2.3 HV1和β-globin标准曲线绘制 将不同梯度浓度的标准品与待测样品同时进行定量PCR扩增,绘制标准曲线,

1.3.2.4 线粒体DNA拷贝数的检测 通过2个单独的实时荧光定量PCR分别对待测样本中线粒体HV1和核β-globin基因进行定量。以线粒体DNA HV1和核单拷贝基因β-globin分别作为线粒体和核DNA拷贝数的标记。线粒体DNA的相对拷贝数/二倍体核基因组(diploid nuclear genome) =2 ×HV1/β-globin。

1.4 RT-PCR检测组织样本mtTFA mRNA的表达

1.4.1 总RNA提取及鉴定 所收集的标本用Trizol试剂提取总RNA,按说明书进行,RNA样品经适当稀释后于紫外分光光度仪上进行测定,记录$D(260)/D(280)$、蛋白质(g/L)、RNA浓度(μg/ml)和纯度(%)。根据RNA浓度计算实际收获的RNA产量:即RNA(μg/ml) ×稀释倍数×0.05。琼脂糖凝胶电泳对RNA样品进行检测,电泳结束后,取出凝胶,置于凝胶成像仪上观察结果,并拍照。

1.4.2 逆转录合成cDNA 逆转录反应用日本宝生物公司TaKaRa RT-PCR Kit(AMV),按要求操作。反应总体积为40 μl,混匀,稍微离心。按以下条件进行反转录反应:30 ℃ 10 min,45 ℃ 3 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,终止反应,-20 ℃保存备用。同时设立阴性对照,即用DEPC去离子水代替样品总RNA。

1.4.3 目的片段的PCR扩增 PCR反应体系50 μl,包括cDNA 2 μl,mtTFA片段上下游引物(10 pmmol/μl)各1.8 μl,β-actin上下游引物(8 pmol/μl)各1.5 μl,10 ×buffer 5 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L) 4 μl,dNTP Mixture(2.5mmol/L)8 μl,*Taq*酶1 U。PCR反应条件为:95 ℃预变性3 min,95 ℃变性40 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸70 s,反应30个循环,72 ℃延伸10 min终止反应,-20 ℃保存备用。

1.4.4 RT-PCR产物鉴定及半定量分析 取样品2 μl与2 μl上样液混合后点样,10 V ×10 min,30 V ×20 min进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察,凝胶成像系统扫描存盘。记录各条带积分光密度,将检测基因与自身β-actin条带积分光密度相比较得到其相对积分光密度。

1.5 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,使用SPSS 11.0统计学分析软件进行t检验和线性回归分析。

2 结果

2.1 克隆质粒的鉴定及标准曲线的制备

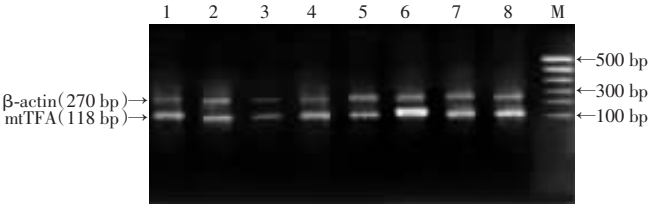
提取经筛选的用于制作标准曲线模板的质粒,经过PCR及序列测定证实,HV1和β-globin基因PCR片段已分别连接至PMD18-T载体上,并用所建立的实时荧光定量PCR检测,可见有明显的荧光信号。根据不同浓度的标准品测得的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(Ct)值绘制标准曲线。不同浓度标准定量的模板与Ct值呈直线相关。HV1和β-globin基因定量PCR标准曲线的相关系数分别为0.998和0.999,斜率分别为-3.159和-3.400。

2.2 肺癌线粒体DNA拷贝数的改变

线性回归分析表明,肺组织线粒体DNA拷贝数和相对应的正常肺组织线粒体DNA拷贝数之间有直接的相关性(r = 0.589, P <0.01)。肺癌组织线粒体DNA的平均拷贝数/细胞为(395 ±125),而相对应的正常肺组织为(733 ±196),前者显著低于后者(P <0.01)。

2.3 肺癌及相应正常肺组织中mtTFA mRNA的表达水平

半定量RT-PCR结果显示,肺癌组织mtTFA mRNA的表达量(mtTFA/β-actin)为(3.029 ±1.177),而相应的正常肺组织表达量为(2.917 ±0.963)(图1),前者虽略高于后者,但差异无统计学意义(P = 0.221)。



1、3、5、7:肺癌组织;2、4、6、8:癌旁组织;M:1 kb DNA Ladder

图1 RT-PCR半定量分析肺癌及相应正常肺组织中mtTFA mRNA表达

2.4 mtTFA mRNA表达与肺癌线粒体DNA拷贝数改变之间的关系

虽然肺癌线粒体DNA的平均拷贝数/细胞显著低于癌旁正常肺组织,但癌组织和癌旁正常组织mtTFA mRNA的表达量之间并无明显差异。线性回归分析结果表明,癌旁正常组织中,mtTFA mRNA的表达量和线粒体DNA拷贝数之间有直接的相关性(r =0.910, P <0.01);而在癌组织中,线粒体DNA拷贝数和mtTFA mRNA的表达水平无关(r =0.135, P >0.05)。

3 讨论

大多数实体性肿瘤中，能量代谢的改变和线粒体 DNA 拷贝数和氧化磷酸化相关酶活性的降低有着密切的联系。在本研究中，我们对肺癌及相对应的非肿瘤肺组织线粒体 DNA 拷贝数进行了精确定量，结果亦发现，肺癌组织线粒体 DNA 的平均拷贝数/细胞显著低于相对应的癌旁肺组织（$P<0.01$）。肿瘤细胞中线粒体 DNA 含量降低的机制目前尚不清楚。有关线粒体 DNA 拷贝数如何控制的研究已进行了数十年，虽然发现和鉴定了许多和 mtDNA 复制有关的调节因子，但对复制过程的具体机制了解得还不多。参与 mtDNA 复制的重要因子包括转录因子 A（mtTFA）、单链 DNA 结合蛋白（mtSSB）、RNA 聚合酶（RNA pol）和线粒体 RNA 加工复合物（MRP）等。哺乳动物 mtTFA 是一种由核编码的相对分子质量约 25×10^3 的小分子多肽，对 mtDNA 控制区内的重链、轻链启动子具有高度的亲和力，但并没有特别的序列特异性。过去，人们通常认为，mtTFA 蛋白的表达主要是诱导 mtDNA 的转录，和 mtDNA 的复制无关。目前的研究表明，和 mtSSB 一样，mtTFA 蛋白的表达直接调节 mtDNA 的拷贝数。Ekstrand 等[4]通过基因敲除和基因转染等方法发现，在各种鼠组织中，mtDNA 的拷贝数和 mtTFA 蛋白的表达量呈显著的正相关。

肿瘤细胞中，控制 mtDNA 转录、复制的调节多肽的表达有何变化，其与肿瘤线粒体 DNA 拷贝数的改变有何关系？这些问题鲜见文献报道。Yin 等[5]利用竞争 PCR 及定量 PCR 等技术检测了 18 例肝癌线粒体 DNA 拷贝数的改变，并分析了这种变化与肝癌 mtSSB mRNA 表达量的关系。mtSSB 是调控 mtDNA 复制、修复和重组过程中的一种关键蛋白，目前已证实，正常组织中这种蛋白的表达量和线粒体 DNA 的含量之间呈显著的正相关。而 Yin 等[5]的研究却发现，癌组织中 mtSSB mRNA 的平均表达量和癌旁正常组织相比虽然明显上调，但女性患者癌组织线粒体 DNA 平均拷贝数显著却低于相应正常组织，男性患者癌组织线粒体 DNA 平均拷贝数无明显变化；mtSSB mRNA 表达量和线粒体 DNA 拷贝数之间的相关性只存在于癌旁正常组织中，而癌组织中这种相关性消失。在本研究中，我们利用半定量 RT-PCR 技术检测了 37 例肺癌及相应癌旁组织 mtTFA mRNA 的表达，并分析了 mtTFA mRNA 的表达量与肺癌线粒体 DNA 拷贝数的降低之间的关系。结果发现，癌组织和癌旁正常组织 mtTFA mRNA 的平均表达量之间无明显差异（$P>0.05$）；线性回归分析结果表明，癌旁正常组织中，mtTFA mRNA 的表达量和线粒体 DNA 拷贝数之间的直接相关，而癌组织线粒体 DNA 拷贝数和 mtTFA mRNA 的表达无关。以上这些研究说明：①肿瘤组织中线粒体 DNA 拷贝数虽然下降，但调控 mtDNA 转录、复制的主要调节因子如 mtSSB、mtTFA 的表达并没有下调；②肿瘤组织中，控制 mtDNA 转录、复制的主要调节因子的表达水平和线粒体 DNA 拷贝数之间无相关性。在前期研究中，我们发现，伴随有 mtMSI 的肺癌组织其线粒体 DNA 平均拷贝数显著低于其余肺癌组织。其他一些学者亦发现，在一些肿瘤中线粒体 DNA 拷贝数的降低和重链复制起始点邻近区域发生的点突变具有显著的相关性。这说明，肿瘤线粒体 DNA 自身遗传结构的改变，如非编码区内的点突变或微卫星不稳定，可能会影响非编码区内的调节序列，改变 mtDNA 的转录及复制的调节因子或诱导剂与 D-loop 的亲和力，从而导致线粒体 DNA 拷贝数的变化[6-9]。综上所述，我们认为线粒体 DNA 自身遗传结构改变和 mtDNA 转录、复制的核调节因子调控功能的丧失等因素共同作用是导致肿瘤线粒体 DNA 拷贝数改变的原因。

参考文献：

[1] Lin C S, Chang S C, Wang L S, *et al*. The role of mitochondrial DNA alterations in esophageal squamous cell carcinomas[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 139(1): 189-197, e4.

[2] Hosgood H D 3rd, Liu C S, Rothman N, *et al*. Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 847-849.

[3] 戴纪刚，肖颖彬，闵家新，等. 非小细胞肺癌线粒体基因组大片段缺失突变研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(21)：2123-2126.

[4] Ekstrand M I, Falkenberg M, Rantanen A, *et al*. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(9): 935-944.

[5] Yin P H, Lee H C, Chau G Y, *et al*. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2004, 90(12): 2390-2396.

[6] Poulton J, Macaulay V, Marchington D R. Mitochondrial genetics 98 is the bottleneck cracked?[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 752-757.

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

[8] Penta J S, Johnson F M, Wachsman J T, *et al*. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Mutat Res, 2001, 488(2): 119-133.

[9] 李歆强，凌贤龙，周源，等. 诱导细胞 mtDNA 缺失以及再转入线粒体后对肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(22)：2225-2227.

（收稿：2010-03-23 修回：2010-05-20）
（编辑 张 维）