短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)19-2134-03

肺癌线粒体 DNA 拷贝数改变和微卫星不稳定性

戴纪刚，肖颖彬，闵家新，张国强，张在永，向明章，吴秋平，姚　珂，周人杰　(400037 重庆，第三军医大学新桥医院心胸外科)

【摘要】 目的　了解和分析肺癌中线粒体基因组拷贝数的改变及微卫星不稳定性(mitochondrial microsatellite instability，mtMSI)。方法　采用PCR-单链构象多态性(PCR Single-stranded conformation polymorphism，PCR-SSCP)分析、序列测定和实时荧光定量PCR等方法，对37例肺癌组织线粒体DNA的拷贝数和线粒体DNA控制区内的微卫星不稳进行检测。结果　肺癌组织线粒体DNA的拷贝数/细胞为(395 ± 125)，显著低于相对应的正常肺组织(733 ± 196)($P<0.01$)。37例肺癌样本中共检出mtMSI 12例(32.4%)。肺癌组织线粒体基因组拷贝数的改变与控制区内的微卫星不稳定性有关($P<0.05$)。结论　肺癌组织中线粒体DNA的拷贝数显著降低，可能与控制区内的微卫星不稳定性有关。

【关键词】 线粒体DNA；肺癌；微卫星不稳定性；拷贝数

【中图法分类号】 R730.23；R734.2　　**【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的非常关键的一步。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。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DNA突变目前已在各种肿瘤及肿瘤细胞株中发现。线粒体DNA序列改变包括发生于编码区及非编码区(即控制区)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(microsatellite instability，MSI)等[1-4]。原发性肺癌中，线粒体DNA的拷贝数是否发生改变？这些改变和线粒体DNA控制区内的遗传不稳定性如MSI是否有关？本研究采用PCR-单链构象多态性分析(PCR Single-stranded conformation polymorphism，PCR-SSCP)、序列测定和实时荧光定量PCR方法，对肺癌组织线粒体DNA的拷贝数和线粒体DNA控制区(displacement loop，D-loop)内的微卫星不稳进行分析。

1　资料与方法

1.1　病例资料

37例肺癌组织和癌旁肺组织标本均取自本科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。本组患者年龄30～75岁，中位年龄为55岁，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。组织学病理分型：鳞状细胞癌23例，腺癌14例。

1.2　组织全基因组DNA提取

采用酚、氯仿、异戊醇抽提法提取全基因组DNA(包括线粒体DNA)。所得DNA溶于TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0)，并用紫外分光光度计测定波长260 nm处光密度值[D(260)值]，计算DNA浓度，－20 ℃保存备用。

1.3　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-tetramethy- rhodamine)，其中FAM作为报告基因，标记在*Taq*Man探针的5′端。TAMRA作为熄灭基因，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。线粒体DNA D-loop HV1引物上游：5′-TTGCACGGTACCATAAATACTTGAC-3′，下游：5′-GAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTG-3′，*Taq*Man探针：5′-CTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAAT-3′，目标片段长度为128 bp。核β-globin基因引物上游：5′-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3′，下游：5′-CAACTTCATCCACGTTCACC-3′，*Taq*Man探针：5′-CTCCTGAGGAGAAGTCTGCT-3′，目标片段长度为110 bp。线粒体DNA控制区MSI分析所用的引物序列和微卫星位点见表1。

表1　mtMSI分析所用的引物序列和微卫星位点

重复序列	起始位点(nt)	线粒体DNA区域(nt)	引物序列(5′→3′)
(PolyC)n	303	D-loop(1)	正义：TCCACACAGACATCATAACA
		267～423	反义：AAAGTGCATACCGCCAAAAG
(CA)n	514	D-loop(2)	正义：CCTCCCACTCCCATACTACTAA
		453～637	反义：GTGATGTGAGCCCGTCTAAACA
(PolyC)n	16 184	D-loop(3)	正义：CACCATGAATATTGCACG
		16 112～16 379	反义：CAAGGGACCCCTATCTGAGG

【基金项目】 国家自然科学基金(39900173)；重庆市自然科学基金(CSTC2009 C195)

【通信作者】 张在永，E-mail：691057831@qq.com

1.4 线粒体 HV1 和核 β-globin 基因实时荧光定量 PCR 检测

1.4.1 实时荧光定量 PCR 标准品的制备 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。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。将部分所提取的质粒经过 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。紫外分光光度计检测其波长 260 nm 处光密度值[*D*(260)]。质粒浓度(ng/μl) = *D*(260) × 50 μg/ml × 稀释终体积(ml) × 1000/稀释时加入的原始溶液体积(μl)。质粒拷贝数(拷贝/μl) = 质粒浓度(ng/μl) × 6.02 × 1014/660 × 碱基数(载体的 + 插入片段的)。以无菌去离子水 10 倍比梯度稀释 HV1 和 β-globin 质粒分别获得 10^3 ~ 10^7 拷贝/μl 的制备定量 PCR 标准曲线的模板。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测 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。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。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。线粒体 DNA 拷贝数的检测[5]：通过两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。

1.5 线粒体 DNA 控制区 MSI 的检测

1.5.1 PCR-SSCP 分析 采用 PCR 为基础的方法扩增线粒体 DNA 微卫星序列。PCR 扩增采用 TaKaRa 扩增试剂盒。PCR 反应体系为 20 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 3 min，其余 30 个循环 94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 10 min，最后 72 ℃延伸 10 min。取扩增产物 5 μl 与等体积的加样缓冲液混合，90 ℃变性 5 min 后，迅速置于碎冰中。肺癌样本与正常组织样本配对加样，在 7.5% 非变性聚丙烯酰胺上低温电泳，电压 50 V。电泳 3 h 后，凝胶银染，在凝胶成像仪上扫描，记录结果。

1.5.2 序列测定 从非变性聚丙烯酰胺凝胶中回收 SSCP 分析中出现的肿瘤异常电泳带（增多或移位的电泳条带）和相应正常肺组织电泳条带，并用原有的引物对进行 PCR 扩增，纯化重新扩增获得的 PCR 产物并对其进行质粒克隆测序，质粒克隆和测序反应由上海基康生物技术有限公司完成。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 检验和线性回归分析。

2 结果

2.1 肺癌线粒体 DNA 拷贝数的改变

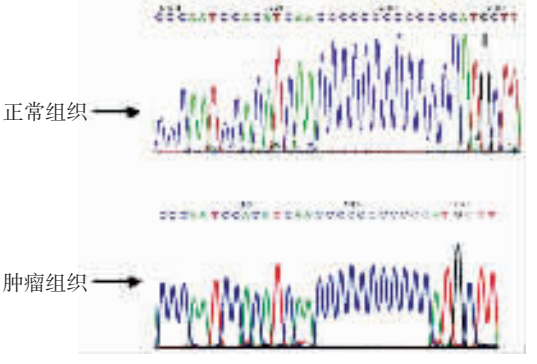
线性回归分析表明，肺组织线粒体 DNA 拷贝数和相对应的正常肺组织线粒体 DNA 拷贝数之间有直接的相关性（$r = 0.589$，$P < 0.01$）。肺癌组织线粒体 DNA 的拷贝数/细胞为（395 ± 125），显著低于相对应的正常肺组织为（733 ± 196）（$P < 0.01$）。肺癌线粒体 DNA 拷贝数的改变与患者性别、年龄、是否吸烟及肿瘤的病理类型无相关性（$P > 0.05$，表 2）。

表 2 肺癌线粒体 DNA 拷贝数的改变和临床指标及微卫星不稳定性的关系

项目	*n*	线粒体 DNA 拷贝数	*P* 值
性别			
女性	9	419 ± 82	0.501
男性	28	396 ± 123	
年龄			
≥55 岁	19	429 ± 129	0.306
<55 岁	18	380 ± 91	
病理类型			
鳞癌	23	388 ± 111	0.948
腺癌	14	427 ± 119	
吸烟情况			
吸烟	24	393 ± 114	0.685
不吸烟	13	419 ± 116	
mtMSI			
阳性	12	334 ± 40	0.017
阴性	25	434 ± 124	

2.2 mtMSI 检测

通过 PCR-SSCP 分析和序列测定，本研究从 37 例肺癌样本中检出 mtMSI 12 例，mtMSI 发生率为 32.4%（12/37）。其中 1 个位点 mtMSI 阳性者 11 例（29.7%），有 2 个位点（D310 和 D16184）mtMSI 阳性者 1 例（2.7%）。分别统计 D-loop 区的 3 个微卫星位点，在 D303（PolyC）n 区和 D16184（PolyC）n 区分别有 7 例和 5 例发现 mtMSI，而在 D514（CA）n 区仅 1 例。图 1 为序列测定分析肿瘤样本线粒体 D16184 位点 MSI 的 1 个例子。



D16184 位点（PolyC）重复开始于线粒体 DNA D-loop 的 16 184 bp 处，止于 16 193 bp 处。正常组织为（C）13 重复，肿瘤组织因出现 2 个 C 核苷酸的缺失而为（C）11 重复

图 1 线粒体 DNA D16184 微卫星位点序列测定

2.3 肺癌线粒体DNA拷贝数的改变和微卫星不稳定性的相关性

含有mtMSI的12例肺癌组织其线粒体DNA的平均拷贝数显著低于其余的肺癌组织($P<0.05$,表2)。

3 讨论

线粒体功能缺陷是肿瘤细胞的重要特征之一,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。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[6,7]。Simonnet等[8]对常见的肾癌(具有侵袭性)、嗜染的肾癌(无侵袭性)和肾嗜酸粒细胞腺瘤进行研究发现,所有的肿瘤其线粒体DNA含量和线粒体酶的活性均发生了显著改变,线粒体酶的活性的降低与肿瘤的类型和分化程度密切相关。本研究对肺癌及癌旁正常肺组织线粒体DNA拷贝数进行了精确定量(拷贝数/细胞),结果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。但并没有观察到线粒体DNA拷贝数的改变与患者性别、年龄、是否吸烟及肿瘤的病理类型之间的相关性。

线粒体DNA自身的结构特点决定了它是致癌物作用的重要靶点,线粒DNA突变发生率被认为是核DNA的10~20倍。目前,点突变、片段缺失、重复或插入突变及微卫星不稳定性等线粒体DNA突变已在各种肿瘤及肿瘤细胞株中发现。线粒体MSI是指线粒体基因组内短的碱基重复序列长度的改变。线粒体基因组中含有多个单和双核苷酸重复序列,即微卫星位点。MSI在肿瘤的发生发展过程中起重要作用,已为人们所认识。目前在胃癌、结肠癌、乳腺癌和肝癌等肿瘤中,mtMSI被发现是一个非常普遍的现象和被认为在这些恶性肿瘤的癌变过程中起重要作用[9-12]。本研究选择D303、D514和D16184 3个控制区微卫星位点对肺癌组织线粒体DNA控制区(D-loop)微卫星不稳进行了分析,37例肺癌样本中,共检出mtMSI 12例(占总数的32.4%),其mtMSI发生率低于结肠癌、乳腺癌,而高于肝癌、胃癌和肾癌[9-12]。

非编码区是肿瘤细胞 线粒体DNA发生突变的热点区域,线粒体MSI也主要发生于这一区域内。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及微卫星不稳定,它们在细胞癌变中的地位和作用,目前还知之甚少。作为线粒体DNA的控制区,非编码区内有线粒体DNA重链转录的启动子、轻链转录的启动子和重链复制起始点。同时,它也是线粒体基因组和核基因组信息交换的枢纽。其在线粒体DNA的转录和复制的控制中起重要作用。肿瘤细胞中线粒体DNA非编码区的遗传不稳定性(包括点突变和微卫星不稳定)虽然并不直接导致编码区序列的改变,但可能会影响非编码区内的调节序列,改变线粒体DNA的转录及复制的调节因子或诱导剂与D-loop的亲和力。因此,可能影响到线粒体DNA的复制和转录。Lee等[13]在肝癌的研究中发现,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。本研究显示,在含有mtMSI的12例肺癌中,线粒体DNA平均拷贝数显著低于其余的25例肺癌组织。这些结果说明,线粒体DNA控制区关键位点或相邻区域内的遗传不稳定性可能会影响线粒体DNA的复制,从而导致线粒体DNA拷贝数的降低。

参考文献:

[1] Yoo J H, Suh B, Park T S, *et al*. Analysis of fluorescence in situ hybridization, mtDNA quantification, and mtDNA sequence for the detection of early bladder cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 198(2):107-117.

[2] Krishnan K J, Blackwood J K, Reeve A K, *et al*. Detection of mitochondrial DNA variation in human cells[J]. Methods Mol Biol, 2010, 628:227-257.

[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] 戴纪刚, 张国强, 魏泓, 等. 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, 肖颖彬, 闵家新, 等. 精确定量肺组织细胞线粒体DNA拷贝数方法的建立[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(18):2033-2034.

[6] Meierhofer D, Mayr J A, Foetschl U, *et al*. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(6):1005-1010.

[7] Mambo E, Chatterjee A, Xing M, *et al*. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer[J]. Int J Cancer, 2005, 116(6):920-924.

[8] 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.

[9] Kim H S, Lim H S, Lee S H, *et al*. Mitochondrial microsatellite instability of colorectal cancer stroma[J]. Int J Cancer, 2006, 119(11):2607-2611.

[10] 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(5):625-629.

[11] 吴凯, 房殿春, 罗元辉, 等. 肝癌微卫星不稳定性及其相关基因突变[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(1):54.

[12] Bianchi N O, Bianchi M S, Richard S M. Mitochondrial genome instability in human cancers[J]. Mutat Res, 2001, 488(1):9-23.

[13] Lee H C, Li S H, Lin J C, *et al*. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma[J]. Mutat Res, 2004, 547(1/2):71-78.

(收稿 2010-03-23 修回 2010-05-20)

(编辑 汪勤俭)