肿瘤干细胞已成为肿瘤领域研究的热点,尽管这项研究还不太成熟,还没形成系统的理论,但肿瘤干细胞的成功分离及鉴定对肿瘤学基础和临床研究具有重要的意义。本研究采用无血清诱导培养的方法,以 CD133 阳性抗原作为干细胞标记物,从 A2780 细胞株中分离鉴定肿瘤干细胞,为后续肿瘤干细胞生物特性的研究及肿瘤干细胞靶向药物的筛选奠定了基础。

参考文献:

[1] Bapat S A. Evolution of cancer stem cells[J]. Semin Cancer. Biol, 2007, 17(3): 204 - 213.
[2] Zhao R C, Zhu Y S, Shi Y. New hope for cancer treatment: exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells [J]. Pharmacol Ther, 2008, 119(1): 74 - 82.
[3] Wicha M S, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea: a paradigm shift[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 1883 - 1890.
[4] Liu L, Zhang X, Du C, *et al*. MEK1-independent activation of MAPK and MEK1-dependent activation of p70 S6 kinase by stem cell factor (SCF) in ovarian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(2): 385 - 389.
[5] Zhang S, Balch C, Chan M W, *et al*. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4311 - 4320.
[6] Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, *et al*. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(3): 506 - 514.
[7] Dick J E. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3547 - 3549.
[8] Brazelton T R, Rossi F M, Keshet G I, *et al*. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497): 1775 - 1779.
[9] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 51(1): 1 - 28.
[10] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730 - 737.
[11] Alvero A B, Chen R, H H, *et al*. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravel the mechanisms for repair and chemoresistance[J]. Cell Cycle, 2009, 8(1): 158 - 166.
[12] Bapat S A, Mali A M, Koppikar C B, *et al*. Stem and progenitor - like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3025 - 3029.
[13] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821 - 5828.
[14] 朱言亮, 陈龙邦, 王靖华, 等. 肺腺癌细胞株 SPC-A1 中侧群细胞的分离与肿瘤干细胞样特征的鉴定[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(5): 681 - 685.

(收稿:2010-10-13 修回:2010-11-10)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2011)04-0359-01

个案与短篇

高原习服适应中白细胞线粒体 DNA 拷贝数的变化规律

罗勇军,刘福玉,陈 丽,高钰琪 (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系高原疾病学教研室,高原医学教育部重点实验室,全军高原生理与高原病研究重点实验室)

【关键词】 线粒体 DNA;拷贝数;高原;习服
【中图法分类号】 R329.28 【文献标志码】 B

线粒体是机体能量工厂,是组织、细胞氧利用的关键场所。90% ~95% 机体耗能通过线粒体的氧化磷酸化作用获得[1]。线粒体在细胞、组织和机体的低氧习服适应过程中发挥着重要的作用[1-2]。线粒体 DNA(mtDNA)与线粒体的功能密切相关,mtDNA 的数量及序列变化可能导致线粒体的功能改变[2-3]。因而本研究观察移居高原 1 年的受试者及高原肺水肿患者白细胞 mtDNA 的拷贝数变化,探讨高原习服适应中 mtDNA 的拷贝数变化规律。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

人血液基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA 公司,美国),定量 PCR 试剂盒(大连宝生物公司);实时荧光定量 PCR 仪(Opticn monitor 1,美国)。

1.2 分组及标本采集

随机选取已经获得高原适应的世居藏族(n = 20),完全高原习服的移居汉族(n = 20),以及未到过高原的平原汉族(n = 19)健康青年男性作为受试者,年龄(19 ± 3)岁、职业均为劳动强度相当的军人。按照中华医学会高原肺水肿的诊断标准,选取年龄相匹配的高原肺水肿患者 20 例[3]。分别在平原和高原采集上述标本空腹静脉血 2 ml(EDTA 抗凝),-20 ℃保存。世居藏族受试者 3 代均为藏族,其本人在西藏高原地区(3 658 m)出生、成长。移居汉族受试者本人在平原出生,从平原移居到 3 700 m 高原时间 1 年,在高原期间未发生急性高原病。上述的样本收集过程中遵循《赫尔辛基宣言》,本研究得到了收集对象的知情同意。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取与定量 采用 OMEGA 公司的全血基因组

(下转 375 页)

【基金项目】 国家自然基金面上项目(30900715);国家科技支撑计划(2009BAI85B01)
【通信作者】 高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gaoy66@yahoo.com

stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg, 2005, 242(1): 55 - 63.

[8] Yu X, Lin S G, Huang X R, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages *via* the MEK-ERK MAP kinase pathway[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27(2): 103 - 109.

[9] Lin B R, Chang C C, Che T F, *et al*. Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2005, 128 (1): 9 - 23.

[10] Chang C C, Shih J Y, Jeng Y M, *et al*. Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(5): 364 - 375.

[11] Moritani N H, Kubota S, Nishida T, *et al*. Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line[J]. Cancer Lett, 2003, 192(2): 205 - 214.

[12] Kang Y, Siegel P M, Shu W, *et al*. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone [J]. Cancer Cell, 2003, 3(6): 537 - 549.

[13] Yang M, Huang H, Li J, *et al*. Connective tissue growth factor increases matrix metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production by cultured renal interstitial fibroblasts[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(6): 817 - 824

[14] Yang F, Tuxhorn J A, Ressler S J, *et al*. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8887 - 8895.

(收稿 2010-10-12 修回 2010-11-18)
(编辑 王小宴)

(上接 359 页)

DNA 抽提试剂盒提取总 DNA，并用 Nanodrop 分光光度仪对 DNA 进行定量。DNA 含量的测定方法为：采用 TE 缓冲液（pH = 8.0）将分光光度仪调零，然后取 1 μl DNA 样本测定波长 260 nm 时的吸光度值，自动生成的结果为 DNA 的浓度。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 mtDNA 的拷贝数 本实验通过测定 mtDNA 的 ND1 基因拷贝数，反映 mtDNA 的拷贝数；β - actin 作为本实验的看家基因，实时荧光定量 PCR 标准品为本室保存的人 β-actin 质粒，通过计算 ND1 拷贝数/β-actin 比值，得到 mtDNA 的相对拷贝数。引物序列：ND1，正义链 5′-ATACAACTACGCAAAGGCCCCA-3′；反义链 5′-AATAGGAGGCCTAGGTTGAGGT-3′。β-actin 正义链 5′-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3′；反义链 5′-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3′。实时荧光定量 PCR 反应体系为：SYRB（含 dNTP、Mg^{2+}、*Taq* 酶、PCR buffer 等）12.5 μl，灭菌水 10.5 μl，基因组 DNA 1 μl，10 pmol/L 的上下游引物共 1 μl。PCR 扩增条件为：95 ℃ 10 s，（95 ℃ 5 s，60 ℃ 20 s 读板）×40 循环。温度从 50 ℃升高到 95 ℃，温度每升高 0.2 ℃读板 1 s，进行融解曲线分析[4]。

1.4 统计学分析

结果以数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并通过 SPSS 12.0 软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

移居高原 1 年的受试者白细胞 mtDNA 的拷贝数为（0.123 8 ± 0.018 0），显著高于平原对照（0.082 2 ± 0.009 4）和高原肺水肿患者（0.029 1 ± 0.005 5）（$P < 0.05$）。高原肺水肿患者中的 mtDNA 拷贝数显著低于平原对照、世居藏族（0.084 7 ± 0.012 8）（$P < 0.05$）。

3 讨论

线粒体是细胞进行氧化磷酸化反应的主要场所，是高等动物细胞核外唯一含有 DNA 的细胞器。mtDNA 的功能不但与其结构完整性有关，还与其拷贝数有关。mtDNA 拷贝数增加被认为是总线粒体呼吸功能的代偿[4]。高原缺氧时线粒体的变化尚不统一，通过低压舱模拟海拔 4 400 m 高原慢性缺氧 9 个月后，大鼠肝脏和心脏每克组织中线粒体蛋白增加，电镜分析发现线粒体数量和体积密度均增加。有文献报道出生并生活在 4 250 m 高原的牛心肌线粒体数目增加 40%，兔和豚鼠心肌和大鼠脑线粒体密度没有增加，而习服高原低氧的人，骨骼肌线粒体数量反而下降[5]。因而缺氧时在细胞分子水平是否通过改变 mtDNA 的拷贝数来促进高原习服适应尚不清楚。每个线粒体内含有多个 mtDNA，缺氧时自由基的生成增加，导致 mtDNA 的拷贝数增加，每个细胞中 mtDNA 的拷贝数增加与机体受到的氧化损伤程度密切相关[6]，mtDNA 的增加可以弥补线粒体的功能降低。本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测白细胞 mtDNA 的相对拷贝数，结果发现 mtDNA 的拷贝数在移居汉族中最高，世居藏族中较低，平原汉族中次之，高原肺水肿患者中最低。提示我们移居高原 1 年时，机体通过增加 mtDNA 的数量，来代偿线粒体的功能，促进高原习服。在获得高原适应的世居藏族中，mtDNA 的拷贝数逐渐降低。高原肺水肿是一种特发于高原低氧环境的肺水肿，也是一种高原习服不良的急性高原病，本室前期研究[7]发现了 mtDNA 3010、mtDNA 3970 等位点的变异与高原肺水肿易感性密切相关，提示 mtDNA 的序列改变导致线粒体的功能改变，最后可能引起高原肺水肿。线粒体的功能改变也与 mtDNA 数目改变密切相关。本研究发现高原肺水肿患者中 mtDNA 的数目很低，提示低 mtDNA 拷贝数可能是高原肺水肿的遗传标记之一，也可能是其发病原因之一。

参考文献：

[1] 罗勇军，高钰琪. 线粒体基因组变异与高原环境适应相关性研究进展[J]. 国际遗传学杂志，2010，33(6)：336 - 339.

[2] Luo Y, Gao W, Gao Y, *et al*. Mitochondrial genome analysis of Ochotona curzoniae and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation [J]. Mitochondrion, 2008, 8 (5/6): 352 - 357.

[3] 罗勇军. 线粒体基因组与高原习服适应相关性的初步研究[D]. 重庆：第三军医大学，2008.

[4] 罗勇军，刘昕. 定量 PCR 的标准品的制备及应用[J]. 重庆医学，2005，34 (3)：414 - 415.

[5] Lee H C, Wei Y H. Mitochondrial role in life and death of the cell [J]. J Biomed Sci, 2000, 7(1): 2 - 15.

[6] 高钰琪. 高原病理生理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：62.

[7] 商学军，黄宇烽，叶章群，等. 褪黑素在活性氧致精子线粒体功能损伤中的保护作用[J]. 中华男科学杂志，2004，10(8)：604 - 607.

(收稿 2010-11-22 修回 2010-12-09)
(编辑 栾 嘉)