论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0216-04

3株人小细胞肺癌细胞系细胞线粒体DNA基因组突变研究

李佩佩[1],梁丽峰[1],常蕊静[1],钱桂生[2],戢福云[2],金发光[1] (710038 西安,第四军医大学唐都医院呼吸与危重症医学科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[2])

[摘要] **目的** 通过碱基序列测定方法对比分析3株人小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)细胞系细胞及其相应的获得性多药耐药细胞系细胞线粒体DNA(mtDNA)基因组突变情况并探讨其潜在的功能变化。**方法** 常规培养人SCLC细胞系细胞H446、H69、H1395及其相应的多药耐药细胞H446/CDDP、H69AR和H1395/CDDP。分别提取基因组DNA后,应用26对mtDNA特异引物PCR扩增mtDNA全长,然后采用PCR产物直接测序法,以修订的剑桥mtDNA序列(rCRS)为标准,分析上述细胞mtDNA基因组突变情况。**结果** 与rCRS序列相比对,H446和H446/CDDP属于mtDNA单倍型G,H1395和H1395/CDDP属于mtDNA单倍型C,而H69和H69/AR属于mtDNA单倍型N。此外,去除各种mtDNA单倍型特有的mtDNA遗传变异位点后发现,6种人SCLC细胞系细胞的mtDNA均存在特异性的碱基突变。这些突变不仅涉及mtDNA编码的tRNA、rRNA二级结构的改变,还涉及线粒体呼吸链相关蛋白的氨基酸种类的改变和氨基酸支链极性的改变,而这些改变可能影响到线粒体氧化(OXPHOS)、细胞凋亡等过程。但是,在各亲代细胞与其相应的多药耐药细胞之间没有发现特异的mtDNA突变。**结论** 人SCLC的发生、发展可能与mtDNA突变密切相关,但其获得性多药耐药性的产生与mtDNA突变无相关性。

[关键词] 小细胞肺癌;线粒体DNA;突变;人
[中图法分类号] R394-33;R394.3;R734.2 [文献标志码] A

Mitochondrial DNA mutations in human small cell lung cancer cell lines

Li Peipei[1], Liang Lifeng[1], Chang Ruijing[1], Qian Guisheng[2], Ji Fuyun[2], Jin Faguang[1] ([1]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi Province, 710038; [2]Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To compare the mitochondrial DNA (mtDNA) mutations between small cell lung cancer (SCLC) cell lines and their corresponding multidrug-resistant cell lines, and to investigate whether the mtDNA mutations were involved in the development and multidrug-resistant phenotype of SCLC. Methods The SCLC cell lines of H446, H69 and H1395, and the multidrug-resistant SCLC cell lines of H69AR, H446/CDDP and H1395/CDDP were cultured. After the genomic DNA was extracted from the 6 cell lines, respectively, the mtDNA genome was amplified and sequenced using 26 primer pairs. mtDNA mutations were determined using DNASTAR Lasergene v7.1 software to compare the sequencing data with the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of mtDNA. Results H446 and H446/CDDP belonged to mtDNA haplogroup G, H1395 and H1395/CDDP belonged to mtDNA haplogroup C, and H69 and H69/AR belonged to mtDNA haplogroup N. Additionally, several mtDNA mutations detected among the SCLC cells mentioned above might not only affect the second structure of rRNA and tRNA, but also cause the changes of amino acid types and their biological properties. The changes might affect mitochondrial oxidation and cell apoptosis. However, no specific mtDNA mutations were detected between the cells of progenitor cell lines and multidrug-resistant cell lines in the present study. Conclusion Multidrug-resistant phenotype of SCLC may not be associated with mtDNA mutation, but the occurrence and development of SCLC might be closely related to mtDNA mutation. The study provides an experimental and theoretical basis for further investigation of the mechanism of SCLC occurrence and development.

[**Key words**] small cell lung cancer; mitochondrial DNA; mutation; human

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071933). Corresponding author: Jin Faguang, Tel: 86-29-84777425, E-mail: jinfag@fmmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81071933)
[通信作者] 金发光,电话:(029)84777425,E-mail:jinfag@fmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0912.007.html(2012-11-28)

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一,且仍处于逐年上升的趋势。在各种类型的肺癌中,小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)占15% ~ 20%。SCLC的癌细胞倍增时间短,进展快,常伴内分泌异常或类癌综合征。虽然SCLC患者对首次化疗非常敏感,但是,90%以上的患者会复发,并且SCLC患者复发后表现出的获得性多药耐药性是化疗失败的最主要原因之一。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)基于其自身高突变性的特点,已成为目前肿瘤研究的热点之一。mtDNA位于真核生物细胞器线粒体内,是由16 569个碱基对组成的环状双链DNA分子,是独立于细胞核染色体外的遗传物质。mtDNA分为非编码区和编码区,非编码区由于突变频率较高,也称之为D-loop区;编码区含有37个基因,其中13个为蛋白质基因,主要编码与细胞呼吸链代谢相关的蛋白质或酶[1-2]。自Anderson等[3]于1981年测定了人mtDNA全序列后,大量研究证实mtDNA变异与人类环境适应性、Leber遗传性视神经病、心肌病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以及多种肿瘤的易感性和发生、发展等密切相关[4-8]。近年来关于mtDNA突变与恶性肿瘤的发生、发展的相关性研究也取得了快速发展,但国内外研究大多仅局限于mtDNA非编码区域,其中对D-loop区的研究最多,而对mtDNA全序列的研究相对很少[9-11]。本研究以修订的剑桥mtDNA序列(revised Cambridge reference sequence, rCRS)为参照[12],通过对比分析3株人SCLC细胞系细胞H446、H69、H1395及其相应的获得性多药耐药细胞系细胞H446/CDDP、H69AR、H1395/CDDP的mtDNA全序列,以期发现若干可能参与人SCLC发生、发展及其多药耐药产生的mtDNA突变位点,旨在为深入探讨人SCLC发生、发展及其多药耐药机制提供一定的实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人SCLC细胞系细胞H446、H1395及其相应的获得性多药耐药细胞H446/CDDP和H1395/CDDP由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所馈赠;H69及其相应的获得性多药耐药细胞H69AR购于美国ATCC;RPMI1640培养基及胎牛血清为Gibco产品(购于英潍捷基上海贸易有限公司,产地乌拉圭);胰酶购于科昊生物工程有限责任公司;基因组DNA提取试剂盒购于天根生化科技北京有限公司;PCR反应试剂Premix *Taq* Version 2.0购于宝生物工程大连有限公司;PCR产物纯化试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 6种细胞系均采用含10%胎牛血清、青链霉素各100 U/mL的RPMI1640培养基,于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养,3 d换液1次,细胞铺满培养瓶底85% ~ 90%后,采用0.25%胰蛋白酶消化、计数、传代。

1.2.2 基因组DNA提取 取对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化离心后,按照细胞基因组DNA提取试剂盒说明书提取细胞基因组DNA,紫外分光光度计测定$D(260)$、$D(280)$值,确定DNA纯度及含量后,样品置-20 ℃储存备用。

1.2.3 PCR扩增及序列测定 采用26对mtDNA引物扩增mtDNA全长。引物序列引自参考文献[13],引物序列见表1,引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。PCR反应体系:2 × Premix *Taq* Mix 10 μL,上下游引物各0.5 μL,DNA模板1 μL,加ddH_2O至20 μL。反应条件为:95 ℃ 3 min预变性后,95 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min共35个循环,最后72 ℃延伸10 min。PCR产物纯化后送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司,在ABI Prism 3700型测序仪上采用脱氧四色荧光染料标记法自动测读序列进行双向序列测定。

表1 PCR扩增mtDNA全长所用的26对引物

引物对编号	引物序列(5′→3′)	3′结合位置(np)	片段大小(bp)	双向测序重叠长度(bp)
1	上游:CTCCTCAAAGCAATACACTG	611	840	202
	下游:TGCTAAATCCACCTTCGACC	1 411		
2	上游:CGATCAACCTCACCACCTCT	1 245	802	204
	下游:TGGACAACCAGCTATCACCA	2 007		
3	上游:GGACTAACCCCTATACCTTCTGC	1 854	860	196
	下游:GGCAGGTCAATTTCACTGGT	2 669		
4	上游:AAATCTTACCCCGCCTGTTT	2 499	887	208
	下游:AGGAATGCCATTGCGATTAG	3 346		
5	上游:TACTTCACAAAGCGCCTTCC	3 169	832	215
	下游:ATGAAGAATAGGGCGAAGGG	3 961		
6	上游:TGGCTCCTTTAACCTCTCCA	3 796	898	203
	下游:AAGGATTATGGATGCGGTTG	4 854		
7	上游:ACTAATTAATCCCCTGGCCC	4 485	975	207
	下游:CCTGGGGTGGGTTTTGTATG	5 420		
8	上游:CTAACCGGCTTTTTGCCC	5 255	814	201
	下游:ACCTAGAAGGTTGCCTGGCT	6 031		
9	上游:GAGGCCTAACCCCTGTCTTT	5 855	827	214
	下游:ATTCCGAAGCCTGGTAGGAT	6 642		
10	上游:CTCTTCGTCTGATCCGTCCT	6 469	886	211
	下游:AGCGAAGGCTTCTCAAATCA	7 315		
11	上游:ACGCCAAAATCCATTTCACT	7 148	987	205
	下游:CGGGAATTGCATCTGTTTTT	8 095		
12	上游:ACGAGTACACCGACTACGGC	7 937	900	196
	下游:TGGGTGGTTGGTGTAAATGA	8 797		
13	上游:TTTCCCCCTCTATTGATCCC	8 621	816	214
	下游:GTGGCCTTGGTATGTGCTTT	9 397		
14	上游:CCCACCAATCACATGCCTAT	9 230	940	205
	下游:TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	10 130		
15	上游:CTTCTATTGATGAGGGTCTT	9 991	670	218
	下游:GGTGTTGAGGGTTATGAGA	10 622		
16	上游:AAGGATTAGACTGAACCGAA	10 404	627	135
	下游:CTGATTGTGAGGGGTAGGA	10 992		
17	上游:CAACCACCCACAGCCTAA	10 857	693	198
	下游:TTGAGAATGAGTGTGAGGCG	11 512		
18	上游:TCACTCTCACTGCCCAAGAA	11 314	802	196
	下游:GGAGAATGGGGGATAGGTGT	12 076		
19	上游:TATCACTCTCCTACTTACAG	11 948	866	166
	下游:AGAAGGTTATAATTCCTACG	12 772		
20	上游:AAACAACCCAGCTCTCCCTAA	12 571	977	242
	下游:TCGATGATGTGGTCTTTGGA	13 507		
21	上游:ACATCTGTACCCACGCCTTC	13 338	970	207
	下游:AGAGGGGTCAGGGTTCATTC	14 268		
22	上游:GCATAATTAAACTTTACTTC	14 000	938	206
	下游:AGAATATTGAGGCGCCATTG	14 998		
23	上游:TGAAACTTCGGCTCACTCCT	14 856	1 162	180
	下游:AGCTTTGGGTGCTAATGGTG	15 978		
24	上游:TCATTGGACAAGTAGCATCC	15 811	765	190
	下游:GAGTGGTTAATAGGGTGATAG	5		
25	上游:CATTATCCCGCACAAGAGTG	16 419	420	160
	下游:TGGAAAGTGGCTGTGCAGACAT	250		
26	上游:CTTTGATTCCTGCCTCATCC	132	540	100
	下游:TAGAAAGGCTAGGACCAAACCT	652		

1.2.4 mtDNA突变的确定 采用DNASTAR. Lasergene. v7.1序列分析软件将本研究获得的序列与rCRS序列进行对比分析。

2 结果

2.1 PCR扩增产物序列测定结果

部分序列测定结果见图1。测序峰清晰锐利,无杂峰。

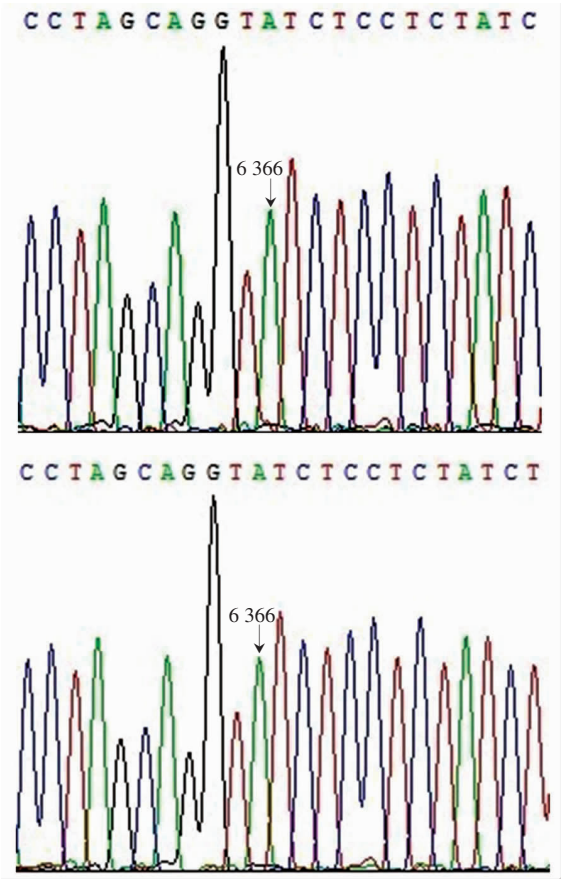


图1 H446(A)及H446/CDDP细胞(B)mtDNA G6366A位点测序结果

2.2 mtDNA测序数据分析

2.2.1 人SCLC细胞系细胞mtDNA单倍型 将人SCLC细胞系细胞H446、H69、H1395及其相应的获得性多药耐药细胞H446/CDDP、H69AR和H1395/CDDP的mtDNA序列与rCRS序列进行比对,结果见表2。

2.2.2 6种细胞mtDNA序列分析 去除各种mtDNA单倍型特有的mtDNA遗传变异位点后发现,6种人SCLC细胞系细胞的mtDNA均存在特异性的碱基突变。这些碱基突变不仅涉及mtDNA编码的转运RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)二级结构的改变(图2),还涉及线粒体呼吸链相关蛋白的氨基酸种类的改变和氨基酸支链极性的改变,而这些改变可能影响到线粒体氧化磷酸化(oxidative phosphorylation,OXPHOS)、细胞凋亡等过程。见表2。

2.2.3 人SCLC细胞系亲代细胞及其相应的多药耐药细胞mtDNA序列比对 3种人SCLC细胞H446、H1395、H69与其各自相应的获得性多药耐药细胞H446/CDDP、H69AR、H1395/CDDP的mtDNA基因组序列完全一致,没有发现特异的mtDNA突变。

表2 6种人SCLC细胞系细胞mtDNA突变及其相应的氨基酸变化

SCLC细胞系	mtDNA单倍型	mtDNA突变位点	mtDNA编码蛋白质	氨基酸变化	氨基酸支链极性变化	tRNA	rRNA
H446、H446/CDDP	G	G6366A	CO1	V155I	疏水>疏水		
		A10086G	ND3	N10D	亲水>酸性		
		A13105G	ND5	I257V	疏水>疏水		
		A15311G	cytB	I189V	疏水>疏水		
		A15824G	cytB	T360A	亲水>疏水		
		G5773A				$tRNA^{Cys}$	
		T3197C					16SrRNA
H69、H69AR	N	G9477A	CO3	V91I	疏水>疏水		
		A9667G	CO3	N154S	亲水>亲水		
		A12308G				$tRNA^{Leu}$	
		A12358G	ND5	T8A	亲水>疏水		
		T13617C	ND5	T427I	亲水>疏水		
		A14793G	cytB	H16R	中性>中性		
		A15218G	cytB	T158A	亲水>疏水		
		A15326G	cytB	T194A	亲水>疏水		
H1395、H1395/CDDP	C	C15904T				$tRNA^{Thr}$	

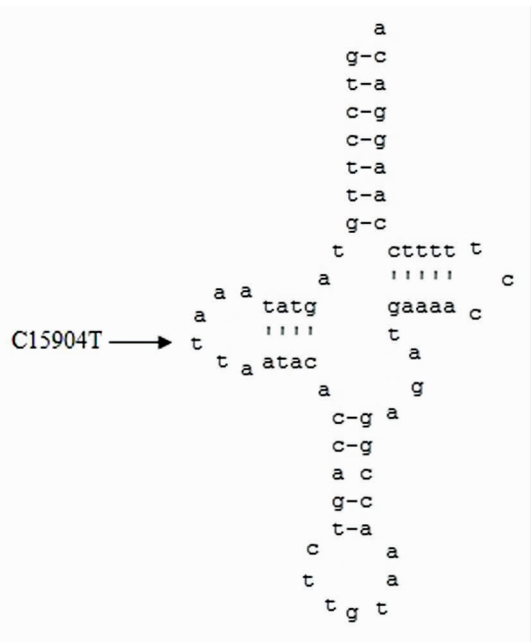


图2 H1395细胞mtDNA C15904T突变导致mtDNA编码$tRNA^{Thr}$二级结构改变模拟图

3 讨论

人SCLC是一种高度恶性的肺部肿瘤,其发生与细胞凋亡异常及DNA损伤修复能力降低等有关。线粒体作为真核生物新陈代谢的"能量工厂",在生命活动中发挥着重要的作用。线粒体通过OXPHOS产生人体必需的能量,活性氧(reactive oxygen species,ROS)作为能量代谢的副产品也随之产生。同时线粒体可通过线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,mtPTP)调节能量输出及以活性氧损伤为基础的细胞凋亡[14]。与核DNA(nDNA)相比,

mtDNA 缺乏组蛋白保护,容易受到线粒体 OXPHOS 产生的 ROS 的攻击,同时线粒体基质中缺乏 DNA 修复酶,mtDNA 损伤后修复效率极低,此外,mtDNA 排列非常紧凑,无内含子区域,基因之间有时互相重叠。因此,mtDNA 突变频率是 nDNA 的 10 余倍,并且任何突变都会累及到基因组中重要的功能区域[15-17]。

基于 mtDNA 的特殊结构和所处的高 ROS 微环境,我们推测 mtDNA 突变可能与 SCLC 的发生、发展及其多药耐药表型有关。为了验证此推测,本研究以 rCRS 为参照,通过分析 3 株人 SCLC 细胞系细胞及其相应的多药耐药细胞系细胞 mtDNA 基因组序列发现,3 株人 SCLC 亲代细胞 H446、H69、H1395 与其相应的多药耐药细胞 H446/CDDP、H69/AR 和 H1395/CDDP 的 mtDNA 基因组序列完全一致,这说明 SCLC 细胞多药耐药的产生与 mtDNA 突变无相关性。

本研究进一步分析各 SCLC 细胞系细胞的 mtDNA 序列后发现,上述 SCLC 细胞系细胞的 mtDNA 存在其特异性的碱基突变。这些突变位点不仅位于 mtDNA 编码的 tRNA 和 rRNA 上,也有部分碱基突变位于 mtDNA 编码蛋白的保守功能区,导致线粒体功能改变。例如,H446 细胞 G5773A 突变位于 mtDNA 编码的 $tRNA^{Cys}$,该突变可能引起线粒体 $tRNA^{Cys}$ 二级结构改变,从而影响 tRNA 携带半胱氨酸的能力,造成谷胱甘肽(glutathione,GSH)合成障碍。GSH 可以清除机体内的 ROS,因此一旦 GSH 合成障碍,则无法有效清除机体新陈代谢产生的自由基,将会导致细胞膜脂质过氧化损伤,进而诱发肿瘤[18-19]。H1395 细胞 C15904T 突变后,$tRNA^{Thr}$ 二级结构中高度保守的二氢尿嘧啶环发生改变,从而影响 $tRNA^{Thr}$ 转运苏氨酸的能力。而位于 mtDNA 编码蛋白基因上的 mtDNA 突变,不仅导致其编码蛋白氨基酸种类的改变,还造成氨基酸支链极性的改变。例如,H446 细胞 A10086G 突变可导致 ND3 亚基第 10 位氨基酸由亲水性的天冬酰胺变成酸性的天冬氨酸,A15824G 突变可造成 cytB 亚基第 360 位氨基酸由亲水性的苏氨酸变成疏水性的丙氨酸。因此,这些 mtDNA 突变可能通过改变 tRNA、rRNA 二级结构、氨基酸种类及其极性影响着线粒体 OXPHOS 途径的正常进行及线粒体介导的凋亡途径,从而参与人 SCLC 的形成及发展。

综上所述,本研究表明,人 SCLC 的发生、发展可能与 mtDNA 突变密切相关,但其获得性多药耐药的产生与 mtDNA 突变没有相关性,为从 mtDNA 突变角度深入揭示人 SCLC 发生、发展机制提供了一定的实验和理论依据。

参考文献:

[1] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science, 1999, 283(5407): 1482-1488.

[2] Wallace D C, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics [J]. Mitochondrion, 2010, 10(1): 12-31.

[3] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(5806): 457-465.

[4] Ji F, Sharpley M S, Derbeneva O, *et al*. Mitochondrial DNA variant associated with Leber hereditary optic neuropathy and high-altitude Tibetans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(19): 7391-7396.

[5] Khogali S S, Mayosi B M, Beattie J M, *et al*. A common mitochondrial DNA variant associated with susceptibility to dilated cardiomyopathy in two different populations [J]. Lancet, 2001, 357(9264): 1265-1267.

[6] Zheng S, Qian P, Li F, *et al*. Association of mitochondrial DNA variations with lung cancer risk in a Han Chinese population from Southwestern China[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31322.

[7] Jin X, Zhang J, Gao Y, *et al*. Relationship between mitochondrial DNA mutations and clinical characteristics in human lung cancer[J]. Mitochondrion, 2007, 7(5): 347-353.

[8] Zheng S, Wang C, Qian G, *et al*. Role of mtDNA haplogroups in COPD susceptibility in a southwestern Han Chinese population[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(3): 473-481.

[9] 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.

[10] Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Life Sci, 2001, 69(25/26): 2957-2964.

[11] 孙恒文, 胡义德. 肺癌细胞系线粒体 DNA 非编码区序列变异研究[J]. 中国肺癌杂志, 2007, 10(2): 124-127.

[12] Andrews R M, Kubacka I, Chinnery P F, *et al*. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA[J]. Nat Genet, 1999, 23 (2): 147.

[13] 侯一平. 法医物证学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 192-195.

[14] Wallace D C. Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(Suppl 2): 8947-8953.

[15] Lee H C, Yin P H, Lin J C, *et al*. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005(1042): 109-122.

[16] Wallace D C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine[J]. Annu Rev Genet, 2005(39): 359-407.

[17] Wallace D C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 8739-8746.

[18] 王静丽, 赵临襄, 景永奎. 谷胱甘肽的耗竭与肿瘤细胞凋亡[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(6): 361-366.

[19] Ballatori N, Krance S M, Notenboom S, *et al*. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases[J]. Biol Chem, 2009, 390(3): 191-214.

(**收稿**:2012-08-08;**修回**:2012-11-08)

(编辑 邓强庭)