DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.033

线粒体 DNA与肿瘤*

综述

Mitochondrial DNA and tumor

戴纪刚** 综述 张国强 魏 泓 审校 (第三军医大学实验动物中心) 重庆, 400038

真核细胞除了核基因组外,还存在核外基因组,即线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)。mtDNA几乎均是小于 20 kb的闭环分子,与核基因组相比,其分子量小,缺乏组蛋白保护,易受致癌物攻击,且缺乏损伤修复系统,因此是致癌物的重要靶点[1,2]。近年来,国外有关 mtDNA与肿瘤关系的研究越来越多,本文就 mtDNA的结构特点及其突变在肿瘤发生中的地位及作用机制作一概述。

1 mtDNA的结构特点

mtDNA是细胞核外唯一存在的 DNA,人 mtDNA是一全长为 16 569 bp的双链闭环分子,一条链为重链,另一条链为轻链,两条链均具有编码功能。mtDNA的信息结构显示出自然界少有的合理性和经济性,在长仅仅约 16.5 kb左右的基因组内,定位了 2种 rRNA 22种 tRNA和 13种蛋白质的基因。而且,除 D环区以外,在相邻的基因之间完全没有或极少有非编码碱基,甚至部分基因之间还有少数碱基的重叠。因此,通常把 mtDNA基因组的控制区即 D环所在区域称非编码区。mtDNA与氧化磷酸化功能密切相关,线粒体是细胞能量生成、储存和供给的场所,在该处经氧化磷酸化方式将能量转化为 ATP高能键,完整的电子传递链是由呼吸链酶复合物(I-V)构成。mtDNA编码的表达产物包括复合物 I(NADH-CoQ还原酶)中的 7个亚单位(ND1 ND2 ND3 ND4 ND4L ND5 ND6);复合物 III(CoQ-CytC还原酶)的一个亚单位(Cyt-b),复合物 IV(CytC氧化酶)的 3个亚单位(COI COII COIII)和复合物 V(ATP合成酶)的 2个亚单位(6和 8)。

mtDNA独立于细胞核 DNA之外独立地进行复制、转录和翻译,具有非常活跃的自我复制能力。每一个细胞可含有许多线粒体。每个线粒体可含有 2~10个 mtDNA分子。与细胞核 DNA不同的是,mtDNA的基因结构全部是外显子,而没有内含子,偶然的 DNA突变通常就可导致 DNA序列的改变,造成编码蛋白质的变化。另外,mtDNA没有组蛋白保护,其本身也不像细胞核 DNA存在有效的基因修复系统,故较核 DNA突变率高[3]。细胞中 mtDNA突变的种类可分为异质性和同质性突变,前者指正常的和突变的 mtDNA共存在于同一细胞;后者指细胞内存在同一种结构 mtDNA[4]。从 mtDNA突变的类型来分,可分为点突变(单点突变、多点突变)和碱基缺失(单个缺失、多个缺失)[5]。mtDNA突变与疾病的关系一直受到广泛的关注[6],由于 mtDNA在体内分布非常广泛,故它的损害可影响多个器官、系统。近年来,越来越多的研究发现:mtDNA基因突变与心血管系统、消化系统、泌尿系统及眼等许多系统疾病有关[7]。

2 mtDNA与肿瘤

线粒体与肿瘤发病关系的研究可追溯到 70年以前。过去的研究主要集中在肿瘤细胞线粒体的形态和能量代谢等方面,发现大多数肿瘤细胞线粒体发育不良,糖的有氧代谢减弱而无氧酵解明显增强等。60年代,由于 mtDNA的发现,人们迅速把目光转向 mtDNA突变与肿瘤发病关系的研究上。

2.1 mtDNA是致癌物作用的重要靶点

mtDNA的结构特点决定了它是致癌物作用的重要靶点。由于 mtDNA是裸露的,缺乏组蛋白保护,所以致癌物容易与之结合。又由于线粒体内脂肪/DNA的比值很高,使具有嗜脂性的致癌物优先在只占细胞总 DNA量的百万分之一到百分之一的 mtDNA中聚集。此外,由于线粒体内氧浓度很高,易产生氧自由基及过氧化氢等物质,它本身又不能合成谷胱甘肽而将这些过氧化物有效地清除,因此 mtDNA易受氧化物损伤,引起突变[8,9]。众多研究结果表明,各种化学致癌物与 mtDNA的结合远比核 DNA有效,结合率更高。Modica等[10]用亲脂性硫氰酸盐 MKT-077体外处理培养的 CRL1420肿瘤细胞及 CV-1正常上皮细胞,培养一段时间后,分离靶细胞的核 DNA和 mtDNA,检测 MKT-077与它们的结合量。结果显示,在肿瘤及正常细胞中,亲脂性的 MKT-077与 mtDNA的结合量显著高于核 DNA。Wunderlich等[11]用 14C标记的 N-甲基亚硝基脲,体外处理培养细胞,结果发现,标记致癌剂优先与 mtDNA结合,N-甲基亚硝基脲与培养细胞 mtDNA的结合量是核 DNA的 5倍。烟雾中含有的多种致癌物质及氧化物,其作用于核 DNA的同时,亦可能引起 mtDNA的损伤和突变。一些研究发现,吸烟者的支气管上皮细胞 mtDNA和核 DNA均出现不同程度的损伤,但 mtDNA的损伤程度显著高于核 DNA[9,12]。Niranjan等[13]亦发现,生物致癌剂黄曲霉素 B1与肝细胞 mtDNA结合量高核 DNA 3~4倍,且这些结合物不易被清除,可在线粒体内较长时间存在。而 mtDNA在整个细胞周期中总是处于不停的合成状态,mtDNA复制更易受外界因素的干扰。故目前认为,各理化、生物等外源性致癌物及氧自由基等内源程序性损伤因子作用于靶细胞后,与核 DNA相比,mtDNA是较容易受攻击的靶分子,常引起 mtDNA的损伤与突变。

2.2 肿瘤细胞内线粒体 DNA数量、结构的改变

大量研究表明,与正常组织相比,肿瘤细胞 mtDNA不仅

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39600079
** 戴纪刚,男,28岁,住院医师,硕士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在数量上发生改变,在结构上也有变化。Boultwood等[14]采用mtDNA探针原位杂交方法检测白血病患者及正常人体的外周血或骨髓细胞 mtDNA,结果发现在所检样本中,所有急性白血病和大部份慢性白血病患者(8/9) mtDNA的拷贝数明显增加。Liang等[15]在对神经胶质瘤细胞的研究中,亦发现 87%(39/45)的肿瘤样本 mtDNA拷贝数不同程度增加。Varma等[16]用毛地黄标记的 mtDNA ND4基因片段作为探针原位杂交方法检测多种石蜡包埋的肿瘤标本亦有类似的发现。但目前肿瘤细胞 mtDNA拷贝数增加的生物学意义尚不清楚。随着有关 mtDNA研究的进一步深入,mtDNA基因精细结构的不断揭示,分析 mtDNA特定基因或特定区域的变异以便能更为精确地找出肿瘤细胞 mtDNA结构的改变已成为当前 mtDNA研究热点。mtDNA为环状双链的 DNA分子,由基因编码区和非编码区组成。mtDNA的非编码区,即 D-Loop,占全部 mtDNA分子的 6%左右,mtDNA的重链及轻链复制起始位点均位于此区域内,因此,D-Loop在 mtDNA的转录和复制中起重要作用。大量研究表明,mtDNA的突变主要发生于此区域内。Ivanova[17]等通过比较人白血病细胞和正常人体细胞 mtDNA核苷酸序列,发现人白血病细胞 mtDNA非编码区存在明显差异,而编码区核苷酸序列无变化。Alonso[18]等采用 PCR-SSCP方法分析了胃癌和结肠癌 mtDNA D-loop的突变,发现 37%的胃癌及 23%的结肠癌标本与正常组织细胞相比存在明显改变。这些 mtDNA遗传改变与肿瘤的恶性增殖有无关联? mtDNA损伤和突变在细胞癌变中又有何作用?这些问题目前均无统一的认识。但可以肯定的是,肿瘤的生物学特性不仅取决于核内遗传物质,而且与核外的 mtDNA亦有一定的关系。Cavalli[19]通过溴化乙锭去除肿瘤细胞的 mtDNA后发现,这些细胞的生长能力明显减低,且对一些抗癌药物的敏感性显著增高。Morais[20]等在卵巢癌的研究中,亦发现 mtDNA的含量与肿瘤的恶性表型有关。

2.3 mtDNA损伤诱发细胞癌变的可能机制

近年来,一些研究发现,某些肿瘤的点突变与 mtDNA的点突变有相关性,但因果关系尚不明确,其中不能排除 mtDNA在核基因组整合并诱发癌变的可能性。事实上亦存在 mtDNA及其片段向核内转移并整合的客观条件。在物理、化学及某些生物因素的作用下,可能会使 mtDNA突变,线粒体膜崩解,而导致 mtDNA及片段游离于胞质中。当胞质中游离的 mtDNA及其片断产生过多,而胞质中 DNA酶及 DNA酶样物质的活性降低时,游离的 mtDNA或其片段即可能会具有类似致瘤病毒那样的作用,穿过核孔,随机整合到核基因组 DNA中。已有研究发现,在一定条件下,核 DNA序列以及 mtDNA序列可以在细胞内游走[21,22]。越来越多的资料表明,肿瘤细胞核基因组中存在着 mtDNA整合的现象。Shay等[23]在对 Hela肿瘤细胞的研究中,发现了 mtDNA细胞色素 C氧化酶亚单位Ⅲ(Cox Ⅲ)在核基因组中的整合,其整合位点位于 C-myc基因组内。整合的结果使细胞产生了融合的 mRNA,这条 mRNA含有来自 C-myc以及 CoxⅢ的遗传信息。Liang等[24]用荧光标记的染色体原位杂交技术(FISH杂交)在早期神经胶质瘤细胞内亦发现有 mtDNA片断核内整合的现象。mtDNA核内整合的结果,即可能导致染色体 DNA不稳,癌基因激活和/或抑癌基因失活,从而使细胞增殖和分化异常,导致细胞癌变。

肿瘤是多因素多步骤发展的产物,各种致癌剂既然能有效的作用于 mtDNA,引起其发生与肿瘤相关的遗传结构改变,其在肿瘤细胞中的生物学意义就应得到重视。如果 mtDNA与肿瘤发生及生物学特性的关系能得以证实,将为肿瘤病因学研究开拓一个新的领域。有关 mtDNA在肿瘤发生发展中地位和作用的研究刚刚起步,目前尚无 mtDNA与细胞癌变直接相关的有力证据,许多设想尚缺乏充分的实验依据。mtDNA损伤及突变与肿瘤的生物学行为有无关联?其损伤及突变在细胞的癌变过程中又起何作用?损伤的 mtDNA在核基因组内整合后,是否可能诱发癌基因激活和/或抑癌基因失活而导致细胞癌变?这些问题均是值得进一步研究的课题。因此,深入研究肿瘤细胞 mtDNA的结构及表达调控变化,探讨 mtDNA突变与肿瘤的关系,对阐明细胞的癌变机制具有重要的意义。

关键词 mtDNA;突变;肿瘤
中图法分类号 R342.3;R73

参考文献

1 Driggers W J, Grishko V I, Ledoux S P, *et al*. Defective repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA of a xeroderma pigmentosum group A cell line. Cancer Res, 1996, 56(6): 1262
2 Baggetto L G. Role of mitochondria in carcinogenesis. Eur J Cancer, 1992, 29A(1): 156
3 Johns D R. Mitochondrial DNA and disease [see comments]. N Engl J Med, 1995, 333(10): 638
4 Shoffner J M, Bialer M G, Pavlakis S G, *et al*. Mitochondrial encephalomyopathy associated with a single nucleotide pair deletion in the mitochondrial tRNALeu(UUR) gene. Neurology, 1995, 45(2): 286
5 Shoffner J M, Wallace D C. Oxidative phosphorylation diseases: Disorders of two genomes. Adv Hum Genet, 1990, 19(3): 267
6 Stoicheff H, Vital G N. Mitochondrial DNA and disease [letter, comment]. N Engl J Med, 1996, 334(4): 270
7 Lestienne P. Mitochondrial DNA mutations in human diseases: A review. Biochimie, 1992, 74(2)123
8 Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, *et al*. Enhanced cellular porliferation and p53 acewmulation in gastric mucosa chromically infected with helicobacter pylori. Am J Clin Patuol, 1997, 108(1): 26
9 Ballinger S W, Bouder T G, Davis G S, *et al*. Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. Cancer Res, 1996, 56(24): 5692
10 Modica J S, Koya K, Weisberg E, *et al*. Selective damage to carcinoma mitochondria by the rhodacyanine MKT-077.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Cancer Res, 1996, 56(3): 544
11 Wundealich V M, Schutt M B, Oraffi A. Preferential alkylation of mitochondrial deoxyribonucleic acid by N-methyl-N-nitrosourea. Biochem J, 1970, 118(2): 99
12 Coller H A, Khrapko K, Torres A, *et al*. Mutational spectra of a 100-base pair mitochondrial DNA target sequense in bronchial epithelial cells: A comparison of smoking and nonsmoking twins. Cancer Res, 1998, 58(6): 1268
13 Niranjan B G, Bhat N K, Avadhani N G, *et al*. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. Science, 1982, 215(3): 73
14 Boultwood J, Fidler C, Mills K I, *et al*. Amplification of mitochondrial DNA in acute myeloid leukaemia [see comments] Br J Haematol, 1996, 95(2): 426
15 Liang Bc, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. Cancer Lett, 1996, 105(2): 167
16 Varma V A, Cerjan C M, Abbott K L, *et al*. Non-isotopic in situ hybridization method for mitochondria in oncocytes. J Histochem Cytochem. 1994, 42(2): 273
17 Ivanova R, Lepage V, Loste M N, *et al*. Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells. Int J Cancer, 1998, 76(4): 495
18 Alonso A, Martin P, Albarran C, *et al*. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. Electrophoresis, 1997, 18(5): 682
19 Cavalli L R, Varella G M, Liang B C, *et al*. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. Cell Growth Differ, 1997, 8(11): 1189
20 Morais R, Zinkewich K, Parent M, *et al*. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. Cancer Res, 1994, 54(14): 3889
21 Zullos A. Mitochondrial D-loop sequences are integrated in the rat nuclear genome. J Mol Biol, 1991, 211(2): 1223
22 Dombroshi B A. Isolation of an active human transposable element. Science, 1991, 254(3): 1805
23 Shay J W. Hela TG cells have mitochondrial DNA inserted into the c-myc oncogene. Oncogene, 1991, 6(2): 1869
24 Liang B C. Evidence for association of mitochondrial DNA sequence amplification and nuclear localization in human low-grade gliomas. Mutat Res, 1996, 354(1): 27

(收稿: 1999-05-06;修回: 1999-08-23)
(编辑 汪勤俭)

应激与神经肽

Stress and neuropeptides

李泽桂* 综述 陆振山** 蔡文琴 审校 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 400038

第一个将应激 (Stress)一词用于生物学和医学的是 Selye, 他对 Stress的解释是,“机体在受到各种有害刺激后,产生的可使机体特异性抵抗力增强的非特异性反应”。以后有人认为给 Stress作如下的定义更为合适,即“应激是机体受到强烈刺激后发生的,以交感神经-肾上腺髓质和垂体-肾上腺皮质功能增强为主要特点的非特异性反应”。此时,① 丘脑下部大量分泌促肾上腺皮质激素释放因子 (Corticotropin-releasing factor, CRF)和血管加压素 (Vasopressin, VP)为主的生物活性肽。② 垂体前叶分泌促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotropin hormone, ACTH)。③ 肾上腺皮质分泌大量的糖皮质激素 (Glucocorticoid)。④ 交感神经和肾上腺髓质释放儿茶酚胺 (Catecholamine)增加。上述激素加上其它神经肽的协同作用[1],共同调节心血管系统,免疫系统和能量代谢系统,以提高机体在紧急情况下,通过改变内环境来适应外界变化的能力。早在 19世纪,生理学家 Bernard首次提出机体有一个维持内环境平衡的调节机制。本世纪初,Walteer从一系列设计严密的实验中发现,在上述机体维持内环境的调节机制中,交感肾上腺髓质系统起重要作用。他观察到应激时组织产生一种称为“Sympathin”的物质,后来被证实为是肾上腺素 (Epinephrine)和去甲肾上腺素 (Norepinephrine)。在以后的 30年中,许多学者发现各种应激都刺激了垂体前叶细胞释放 ACTH, ACTH又刺激糖皮质激素从肾上腺皮质分泌入血,血中升高的皮质激素又反过来抑制 ACTH在前叶的释放。另外,儿茶酚胺也通过与神经肽的关系间接影响 ACTH的分泌。近年来,随着神经内分泌学的进展,特别是分子生物学技术的建立,通过对血中,组织中应激激素及其受体的超微量测定,已经发现了许多神经肽在应激中发生变化。本文主要介绍 CRF和 VP在应激反应中的变化。

1 应激与 CRF

促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF)是应激反应的主要调节者[2],通过控制丘脑下部-垂体-肾上腺轴发挥作用[3]。Saffran和 Guillemin在体外实验中,首次发现丘脑下部提取物能使垂

* 李泽桂,女,46岁,副教授,博士研究生
** 华西医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室 成都, 610041

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net