

大肠癌细胞线粒体DNA D-环区的突变

阎丽, 肖冰, 宋卫兵, 叶方鹏, 赖卓胜

阎丽, 肖冰, 宋卫兵, 叶方鹏, 赖卓胜, 南方医科大学南方医院消化病研究所 广东省广州市 510515

项目负责人: 肖冰, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院消化病研究所. xiaobing@fimmu.com

电话: 020-61641545

收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-11-22

摘要

目的: 研究大肠癌细胞线粒体DNA D-环区突变情况。

方法: 用PCR与直接测序相结合的方法, 对比分析三株大肠癌细胞系和1例原代培养的正常肠上皮细胞的线粒体DNA D-环区的突变位点。

结果: 三株大肠癌细胞系和1例正常的肠上皮细胞的线粒体DNA D-环区均存在不同程度的点突变, 其中72位C→T, 73位A→G, 16298位C→T, 16519位T→C这四个突变位点在三株癌细胞和正常肠上皮细胞中均检测到, 考虑为多态性变化。在SW480和LOVO细胞线粒体中检测到16224位T→C、16311位T→C两个相同的突变位点, 在SW480和HT29细胞线粒体中检测到114位C→T、498位C→T、16234位C→T三个相同的突变位点。

结论: 大肠癌细胞线粒体DNA D-环区具有多态性和突变性, 特征性的突变可能与大肠癌的易感性有关。

阎丽, 肖冰, 宋卫兵, 叶方鹏, 赖卓胜. 大肠癌细胞线粒体DNA D-环区的突变. 世界华人消化杂志 2005;13(1):97-99

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/97.asp>

0 引言

肿瘤的发生是一个涉及多基因、多因素、多阶段的过程。在研究细胞核中癌基因、抑癌基因的变化方面, 人类已经取得了很大的成就, 但核基因的变化难以解释问题的全部^[1-2]。一系列实验表明线粒体DNA是细胞核外的遗传物质, 参与了维持细胞的肿瘤特性^[1, 3]。人类线粒体的基因组全长16 569 bp, 是环状、双链DNA, 定位了2种rRNA、22种tRNA和13种蛋白多肽基因, 分为编码区和非编码区, 即D-环区。D-环区包括重链的复制起点等重要序列。线粒体DNA的结构特点及其在DNA复制和损伤修复方面的特性使他的突变率比核染色体高10-100倍^[4-6], 多项研究发现线粒体基因的D-环区可能为线粒体DNA突变的热点所在。但不同的肿瘤, 有关该区突变的频率报道存在明显差异^[7-13]。大肠肿瘤细胞的线粒体DNA突变, 国内未见有文献报告, 国外虽有文献报告, 但意见不一。为确定大肠癌细胞中线粒体D-环区是否存在突变, 以及突变与大肠癌的发生机制是否有一定的相关性, 我们对三株大肠癌细胞系和一例原代培养的正常肠上皮细胞的线粒体DNA的D-环区进行了对比研究。

1 材料和方法

1.1 材料 选用的三株大肠癌细胞系即LOVO、HT29和SW480由南方医院消化病研究所提供, 正常的肠上皮细胞是由实验室原代培养。线粒体DNA提取试剂盒由杭州V-gene公司提供, PCR扩增试剂盒购自清华大学天为时代公司的2×Pfu PCR MasterMix 一管便捷式试剂盒。两对引物由上海博亚生物技术有限公司合成。引物1: 5'-GATCACAGGTCTATCACCTATTAA-3' 引物2: 3'-GCAGATTGTGAAAAGTCACATAACG-5' 扩增包括1-576 bp在内的626 bp, 引物3: 5'-CTATTCTCTGTTCTTTTCATGGGGAA-3' 引物4: 3'-GTAGCACTACAGAATAAATTTCCCCT-5' 扩增16014-16569 bp的556 bp。

1.2 方法 线粒体DNA模板的制备, 操作步骤按照杭州V-gene公司提供的线粒体DNA提取试剂盒的说明进行。将提取的线粒体DNA用紫外分光光度计于260 nm波长测定DNA含量。将提取的大肠癌细胞和正常的肠上皮细胞的线粒体DNA分别进行PCR扩增, PCR扩增反应体系: 模板1 uL, 20 mmol/L的引物各1 uL, 2×Pfu PCR MasterMix 12.5 uL, 加离子水至反应的总体积到25 uL。用PCR仪(Biometra)进行反应: 起始变性温度94℃, 5 min; 以下过程30个循环: 变性94℃, 45 s; 复性50℃, 1 min; 延伸72℃, 1 min。结束延伸温度72℃, 5 min。取3 uL的PCR反应产物于12 g/L的琼脂糖凝胶上电泳。凝胶图像分析系统检测条带的平均灰度值。确定线粒体DNA的D-环区成功扩增后, 将经PCR产物纯化试剂盒纯化后PCR产物, 在美国产ABI377测序仪上采用双脱氧四色荧光法全自动测读序列, 与基因库数据对照(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 将大肠癌细胞与正常的肠上皮细胞的线粒体DNA D-环区测序结果与公布的线粒体DNA D-环区序列做对照。当大肠癌细胞的线粒体DNA D-环区的核苷酸序列与正常肠上皮不相同, 这种改变为突变; 当大肠癌细胞的线粒体DNA D-环区的核苷酸序列与正常肠上皮相同、但与基因库记载不同时, 这种改变为多态性变化。发现突变后, 用PCR重新扩增线粒体D-环区, 用不同的引物正反两个方向再次测序以证实突变确实存在。

2 结果

2.1 PCR扩增产物的鉴定 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果表明PCR扩增产物与目的片段产物大小一致(图1-2)。

2.2 PCR产物测序结果分析 大肠癌细胞线粒体DNA D-环区共检测到15个突变位点, 其中4个突变位点考虑为多态性变化。其他11个突变位点中除了在LOVO细胞系线粒体DNA D-环区的64位和65位间检测到1个插入序列G, 另外的10个突变位点均为碱基置换(表1)。

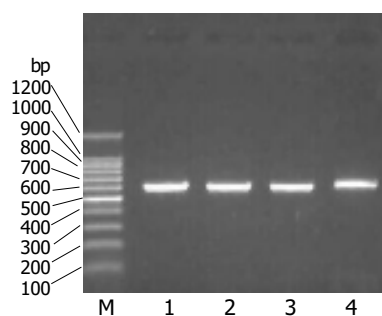


图1 D-环区包括1-576 bp的626 bp扩增片段.图1-4 分别为 LOVO、SW480、HT29 和正常肠上皮细胞 D-环区的扩增片段.

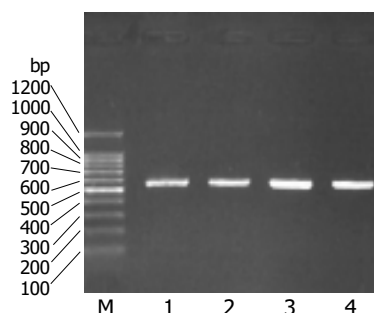


图2 D-环区16014-16569 bp的556 bp扩增片段.图1-4 分别为 LOVO、SW480、HT29 和正常肠上皮细胞 D-环区扩增片段.

3 讨论

大肠癌细胞线粒体DNA D-环区共检测到15个突变位点,其中72位C→T,73位A→G,16298位C→T,16519位T→C这4个突变位点在三株癌系细胞和正常肠上皮细胞中均检测到,考虑为多态性变化,可见大肠癌的线粒体DNA D-环区是一个具有多态性变化的区域.由于线粒体DNA的核苷酸序列是由Sanger *et al*于1981年通过西方人线粒体DNA测序得出的,因此在东方人的大肠癌细胞株及正常的肠上皮细胞中出现的多态性改变也是人种和地域差异的反映.

在三株大肠癌细胞中均检测到了与正常肠上皮和基因库记载不同的核苷酸变化,考虑为突变,突变率为100% (3/3),在11个突变位点中,LOVO细胞系线粒体DNA D-环区的64位和65位间检测到1个插入序列G,另外的10个突变形式均为碱基置换,其中在SW480和LOVO中检测到16224位T→C、16311位T→C两个相同的突变位点,在SW480和HT29中检测到114位C→T、498位C→T、16234位C→T三个相同的突变位点,不同的大肠癌细胞系检测到的相同的突变位点考虑为特征性改变,而这些特征性的改变目前认为可能和大肠癌的易感性有关,但是否致癌有待于进一步研究.

表1 大肠癌细胞线粒体DNA D-环区的突变

大肠癌细胞株	突变位点	数据库核苷酸序列	正常肠上皮细胞核苷酸序列	大肠癌细胞核苷酸序列
LOVO	33	C	C	G
	72	C	T	T
	73	A	G	G
	146	T	T	C
	16222	C	C	T
	16224	T	T	C
	16270	C	C	T
	16298	C	T	T
	16311	T	T	C
	16519	T	C	C
HT29	72	C	T	T
	73	A	G	G
	114	C	C	T
	498	C	C	T
	16217	T	T	C
	16234	C	C	T
	16298	C	T	T
	16519	T	C	C
SW480	72	C	T	T
	73	A	G	G
	114	C	C	T
	498	C	C	T
	16224	T	T	C
	16234	C	C	T
	16298	C	T	T
	16311	T	T	C
	16519	T	C	C

大肠癌是一种涉及许多基因的多因素多阶段的恶性肿瘤, 大肠癌细胞的线粒体 DNA D- 环区的改变, 国内未见有文献报道, 国外虽有文献报告, 但意见不一, 不尽相同. Polyak *et al*^[9] 对 10 个结肠癌细胞系线粒体 DNA 突变研究中, 发现有 7 个系存在突变, 在 12 种体细胞突变形式中, 有 11 种是单个碱基的替换, 一个是插入突变, 而且发现线粒体 DNA 的突变比核的突变至少多 10 倍. 本实验所用的三株大肠癌细胞株所检测到突变形式与其结果吻合. 由此可见大肠癌细胞线粒体 DNA 的 D- 环区是一个具有多态性和突变性的区域, 而这些多态性和突变性可能导致了线粒体 DNA 的 D- 环区的高度不稳定性, D- 环区的高不稳定性进而影响了编码区的稳定, 导致了编码区的突变. Marchington 和 Habano *et al*^[14-15] 也报道了 D- 环区的突变与编码区的突变有关, 并认为某些编码区的突变能引起蛋白质的合成改变, 影响线粒体的功能, 进而对细胞的功能产生影响, 推测线粒体的基因改变将引起其功能异常, 释放大量的活性氧自由基, 而这些活性氧自由基能造成核基因损伤 (癌基因和抑癌基因等)^[16], 从而引起肿瘤. 但这种推测尚需进一步研究证实.

总之, 大肠癌线粒体 DNA 的 D- 环区是一个具有多态性和突变性的区域, 特征性的突变可能和大肠癌的易感性有关, 但大肠癌线粒体 DNA D- 环区的高突变性究竟是否是大肠癌发生的原因以及是大肠癌发生的原因还是结果尚需研究证实.

4 参考文献

- 1 Luciane RC, Bertrand CL. Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutat Res* 1998; 398:19-26
- 2 Jerry WS, Harold W. Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? *Mutat Res* 1987;186:149-160
- 3 Kunkel TA, Loeb LA. Fidelity of mammalian DNA polymerase. *Science* 1981;213:765-767
- 4 Nirajan BG, Bhat NK, Avadhani NG. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science* 1982;215:73-75
- 5 Sager R. Genetic suppression of tumor formation. *Adv Cancer Res* 1985;44:45-68
- 6 Backer JM, Weinstein IB. Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo [a] pyrene. *Science* 1980;209:297-299
- 7 Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumor and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019
- 8 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;118:835-841
- 9 Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colonic tumors. *Nat Genet* 1998;20:291-293
- 10 Habano W, Sugai T, Yoshida T, Nakamura S. Mitochondrial gene mutations, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;83:629-635
- 11 Heerdt BG, Chen J, Stewart LR, Augenlicht LH. Polymorphisms, but lack of mutations or instability, in the promoter region of the mitochondrial genome in human colonic tumors. *Cancer Res* 1994;54:3912-3915
- 12 Allen M, Andreasson H. Mitochondrial d-loop and coding sequence analysis using pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2004;297:179-196
- 13 Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 2001;488:9-23
- 14 Marchington DR, Poulton J, Sellar A, Holt IJ. Do sequence variants in the major non-coding region of the mitochondrial genome influence mitochondrial mutations associated with disease? *Hum Mol Genet* 1996;5:473-479
- 15 Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: Evidence for mismatch repair system in mitochondrial genome. *Oncogene* 1998;17:1931-1937
- 16 Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, Takase T, Taguchi M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2001;94:429-431

编辑 张海宁