

# 胞质异质性——人类肿瘤组织线粒体基因突变的普遍现象

谭端军<sup>1</sup>, 刘玲玲<sup>1</sup>, 文毅<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1</sup>, Julia Chang<sup>2</sup>, Kun-Tu Yeh<sup>2</sup>,  
LeeJun C Wong<sup>3</sup>

(1. 解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853; 2. 彰化基督教医院病理科, 彰化, 中国台湾 500; 3. 乔治城大学医学中心分子与人类遗传研究所, 华盛顿, 美国 20007)

**摘要:**为了探讨不同肿瘤组织中线粒体基因体细胞性突变的胞质异质性和同质性状态, 利用 32 对重叠引物对 149 例肿瘤组织和匹配正常组织的全线粒体基因进行 PCR 扩增, 并同时进行时相温度梯度凝胶电泳扫描突变筛选, 基因测序确定突变类型与异质状况。结果表明, 不同肿瘤组织中线粒体基因体细胞性突变的异质率不同, 口腔癌(65%)和食道癌(64%)具有较高的异质率, 其次为乳腺癌(45.9%)。4 种转换形式的发生频率以 Hm→Hm > Hm→Ht > Ht→Hm > Ht→Ht 为主。碱基转换的主要转换形式为 Hm→Hm, 碱基颠换则以 Hm→Ht 为主。认为胞质异质性是人类肿瘤组织线粒体基因突变的普遍现象。

**关键词:**线粒体基因; 突变; 异质性; 同质性; 肿瘤

中图分类号: Q754, R73

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)01-0044-05

## Heteroplasmy: A Common Phenomenon of Mitochondrial Genome Mutations in Human Tumor Tissues

TAN Duan-Jun<sup>1</sup>, LIU Ling-Ling<sup>1</sup>, WEN Yi<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, Julia Chang<sup>2</sup>, Kun-Tu Yeh<sup>2</sup>, LeeJun C Wong<sup>3</sup>

(1. *Institute of Geriatric Cardiology of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;* 2. *Department of Pathology, Changhua Christian Hospital, Changhua, China Taiwan 500;* 3. *Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University Medical Center, Washington DC 20007, USA*)

**Abstract:** To explore the status of heteroplasmy and homoplasmy of mitochondrial DNA somatic mutations in different tumors, DNA from 149 tumors and corresponding normal tissues were extracted and entire mitochondrial genome was amplified using 32 pairs of overlapping primers. The somatic mutations were screened by temporal temperature gradient gel electrophoresis and their heteroplasmic statute were identified by sequencing. The results showed that the incidence rate of heteroplasmy of mitochondrial DNA somatic mutations varies in different tumors. There is a higher rate of heteroplasmic mutation in oral cancer (65%) and esophageal cancer (64%), followed by breast cancer (45%). The frequency of four transfer types is sequentially Hm (homoplasmy)→Hm > Hm→Ht (heteroplasmy) > Ht→Hm > Ht→Ht. The main transfer forms of transition and transversion mutations are Hm→Hm and Hm→Ht respectively. Heteroplasmy is a common phenomenon in mitochondrial DNA somatic mutations of human tumors.

**Key words:** mitochondrial genome; mutation; heteroplasmy; homoplasmy; tumor

收稿日期: 2003-12-12; 修回日期: 2004-03-17

基金项目: 中国人民解放军总医院院长基金资助(03YZJJ005) [Supported by Dean Grant 03YZJJ005 of Chinese PLA General Hospital]

作者简介: 谭端军(1963—), 男, 副主任医师, 副教授, 博士, 美国乔治城大学博士后, 主要从事老年疾病的防治研究, 尤其是线粒体基因变异与老年疾病的关系。Tel: 010-66937878(H); 13520063803(C), E-mail: TDJ301@yahoo.com.cn

线粒体几乎存在于人体的所有细胞中,每个细胞中含有成百上千个线粒体,因此部分细胞在连续分裂过程中发生有丝分裂遗传漂变(mitotic segregation)而导致组织中同时存在含野生型 DNA 和突变型 DNA 的两种细胞,这种状态称为线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)的胞质异质性(heteroplasmy, Ht)。目前的研究表明众多的神经肌肉疾病中存在 mtDNA 缺失性突变和点突变,而且许多 mtDNA 突变呈异质性,异质性突变 mtDNA 的比例可从 0 到 100%<sup>[1,2]</sup>,刘玲玲等<sup>[3]</sup>也在吸烟肺癌患者的口腔黏膜细胞中发现大量异质性的获得性线粒体基因突变。毛宝龄<sup>[4]</sup>等分析癌细胞 mtDNA 控制区序列的变化特征,结果表明癌细胞和癌患者白细胞 mtDNA 重链复制起点及其相邻 D 环区的特征性突变可能与细胞癌变/或癌的易感性有关。并有研究提示 mtDNA 的突变与肿瘤的发生、细胞的凋亡具有密切的关系<sup>[5,6]</sup>,那么,是否线粒体基因体细胞性突变在肿瘤组织中也存在胞质异质性呢?或者是否在肿瘤发生风险的改变上扮演了潜在的角色?为此本研究对 5 种人类常见的肿瘤的线粒体基因异质性和同质性体细胞突变情况进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织样本和 DNA 抽提

冷冻的肿瘤组织和匹配的癌旁正常组织由乔治城大学医学中心 Lombard 癌症中心组织病理库和中国台湾彰化基督教医院提供,所有肿瘤均经病理学证实。它们包括乳腺癌 73 例、肺鳞状细胞癌 18 例、食道癌 20 例、口腔癌 18 例和原发性肝细胞癌 20 例。蛋白酶 K 和酚-氯仿抽提总 DNA,稀释至 5 ng/ $\mu$ L 供聚合酶链反应使用。

### 1.2 体细胞性突变的筛选

使用 32 对交叉重叠引物扩增线粒体 16.6 kb 全长基因,所得片段长度为 306~805 bp,平均 594 bp,扩增片段全长 18 953 bp,由于扩增区重叠,它较实际 mtDNA(16 569 bp)长 14%。尔后,采用时相温度梯度凝胶电泳(temporal temperature gradient gel electrophoresis, TTGE)对所有的 DNA 片段进行配对突变筛选,PCR 引物、序列和 TTGE 条件参见文献报道<sup>[7,8]</sup>。在 TTGE 分析中单一条带的迁移变化代表着同质性的 DNA 改变,出现多条带则代表异质性的突变。异质性条带的特征是具有单个突变时为

4 条带,包括两个纯合复性和两个杂合复性的 DNA 片段,多个突变时可多于 4 条。与 PCR 非特异扩增时的条带鉴别在于非特异扩增的条带是无序的排列,多数含有信号强度不等的多个条带,一般而言,这种现象会同时出现在其他同时和同一条件扩增的其他 DNA 片段中,最终依赖于 TTGE 和测序结果相结合来进行鉴别。

### 1.3 同质与异质状况的确定

对肿瘤组织和匹配的正常组织进行配对分析,在 TTGE 进行突变筛选的基础上,对任何显示肿瘤和正常组织电泳条带类型不同的 DNA 片段,进行直接基因测序,以明确体细胞性突变的类型,并最终确定同质和异质状况。DNA 测序采用荧光染料链终止测序试剂盒(Perkin Elmer)于 ABI377(Applied Biosystem)自动测序仪上进行。DNA 测序结果利用 MacVector™ 7.0 (Oxford Molecular Ltd, Oxford, England)软件对比分析。分别统计各种肿瘤组织中体细胞性突变的总数,以及各类突变在不同肿瘤组织中所发现的突变总数中的所占百分比。

## 2 结果

### 2.1 不同肿瘤组织中的异质率

由表 1 显示在所有检测到线粒体基因体细胞性突变的 5 种肿瘤患者中,不论正常组织或是肿瘤组织均呈现一定的异质性,但不同肿瘤组织中线粒体基因体细胞性突变的异质率不同,口腔癌(65%)和食道癌(64%)具有较高的异质率,其次为乳腺癌(45.9%)、肝癌及肺癌组织的异质率最低(16%~20%),统计学分析显示各组间具有明显的差别。正常组织中的异质率与肿瘤组织具有基本相同趋势。表 1 中还显示了点突变与插入缺失突变的发生情况,结果显示除食道癌外,其他 4 种肿瘤的插入和缺失突变发生率均低于点突变。值得提出的是这些体细胞性突变中约有 20%~60%不等的回复性改变,但与肿瘤类型没有明显的关系。

### 2.2 体细胞性突变的转换形式

针对体细胞性突变的不同转换形式进行统计分析(图 1),发现肝癌和肺癌以正常组织的同质性向肿瘤组织的同质性突变转换为主,约占 60%以上,食道癌和口腔癌则以正常组织的同质性向肿瘤组织的异质性转换为主,约占 40%,统计学显示不同肿瘤组织中突变的转换形式具有显著性差异。

表 1 肿瘤组织全线粒体基因突变 TTGE 和测序对各类突变的判别

Table 1 Identification for mutations of entire mtDNA genome in tumors using TTGE and sequence

项目 n Item n(%) *	乳腺癌 Breast cancer	食道癌 Esophageal cancer	肝癌 Liver cancer	口腔癌 Oral cancer	肺癌 Lung cancer	P 值 *** P value	合计 Total
病例数 Total number of cases	73	20	20	18	18		149
发现的体细胞性突变的总数 Total number of somatic mutations	74	14	24	26	29		167
肿瘤组织中呈异质性的突变数 Heteroplasmic mutation number in tumor tissues	34(45.9)	9(64.3)	4(16.7)	17(65.4)	6(20.7)	0.0003	70(41.9)
正常组织中呈异质性的突变数 Heteroplasmic mutation number in normal tissues	28(37.8)	6(42.8)	4(16.7)	13(50.0)	5(17.2)	0.0284	56(33.5)
插入与缺失突变 Insertion & deletion mutations	17(23.0)	9(64.3)	9(37.5)	10(38.5)	8(27.6)	0.0313	53(31.7)
点突变 Point mutations	57(77.0)	5(35.7)	15(62.5)	16(61.5)	21(72.4)	0.0313	114(68.3)
回复性点突变 ** Back-change mutations	30(52.6)	2(40.0)	3(20)	9(56.3)	6(28.6)	0.0822	50(43.9)

注: \* 括号内数值表示此类突变占总突变数的百分率。 \*\* 括号内数值为回复性突变占点突变数目的百分率。 \*\*\* 统计方法:  $\chi^2$  检验。

Note: \* the number in bracket refers to the percentage of this kind of mutation in total mutations. \*\* the number in bracket refers to the percentage of back-change mutation in total point mutations. \*\*\* statistic method:  $\chi^2$  test.

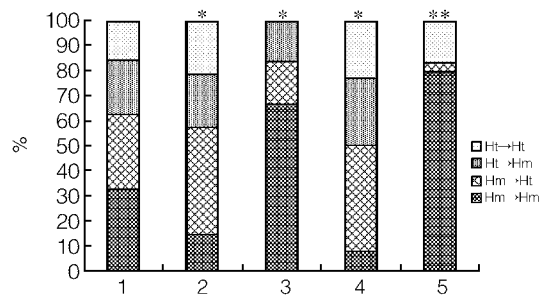


图 1 不同肿瘤组织中 4 种转换类型所占百分比

Hm→Hm 表示同一个体的正常组织和肿瘤组织均表现为同质状态; Hm→Ht (homoplasmic→heteroplasmic) 表示正常组织为同质状态, 而肿瘤组织突变为异质状态; Ht→Hm 在正常组织中为异质状态, 而肿瘤组织中则转变为同质状态; Ht→Ht 表示在正常组织和肿瘤组织中均为异质状态, 但突变型的 DNA 分子所占百分率不同。 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

1: 乳腺癌; 2: 食道癌; 3: 肝癌; 4: 口腔癌。

Fig. 1 The percentage of four kinds of transitions in different tumors

Hm→Hm means that all mutations are homoplasmic status in normal and tumor tissues in the same case. Hm→Ht (homoplasmic→heteroplasmic) means that the mutations are homoplasmic status in normal tissues, but heteroplasmic in tumors. Ht→Hm means that the mutations are changed from heteroplasmic status in normal tissues to homoplasmic in tumors. Ht→Ht means that the mutations are heteroplasmic in both normal and tumor tissues. But there is a quantitatively different proportion of the mutant mtDNA. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

1: breast cancer; 2: esophageal cancer; 3: liver cancer; 4: oral cancer; 5: lung cancer

## 2.3 不同基因区、呼吸链复合物、突变类型与异质性的关系

表 2 显示在线粒体基因中 mRNA、rRNA 和 D 环区的体细胞性突变中, 大部分由正常组织同质状态向肿瘤组织的同质或异质状态转变, 而由正常组织的异质状态向肿瘤组织的同质状态转变或两者均呈现异质状态仅所占百分率不同的情况相对较少。4 种转换形式的发生频率  $Hm \rightarrow Hm > Hm \rightarrow Ht > Ht \rightarrow Hm > Ht \rightarrow Ht$ 。虽然统计学分析尚未达到显著意义水平, 但  $P$  值接近 0.05。

mtDNA 参与了线粒体呼吸链氧化磷酸化过程 5 个复合体中的 4 个复合体 (复合体 I、III、IV、V) 的基因编码。我们对这 4 种复合物中的体细胞性突变的转换形式进行分析也同样显示以正常组织同质状态向肿瘤组织的同质或异质状态转变为主, 但统计无显著差异。

分析体细胞性突变的类型我们发现碱基转换的主要表现形式为 Hm→Hm, 占半数以上, 其次为 Hm→Ht 和 Ht→Hm; 碱基颠换则以 Hm→Ht 为主; 插入性突变主要表现为 Hm→Ht 和 Ht→Ht; 缺失突变多为 Ht→Ht, 而其他 3 种形式无明显差异。

表 2 不同线粒体基因区与呼吸链氧化磷酸化复合物的突变异质性情况

Table 2 Heteroplasmic status of mitochondrial mutations in different gene regions and complexes of oxidative phosphorylation system

突变区域 Mutation region	Hm→Hm	Hm→Ht	Ht→Hm	Ht→Ht	合计 Total
各基因区 组间比较 $\chi^2$ 值 16.47, $P=0.0576$ Gene area, compare within groups $\chi^2$ value 16.47, $P=0.0576$					
mRNA	20(46.5)	11(25.6)	7(16.3)	5(11.6)	43
tRNA	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	3
rRNA	5(41.7)	6(50.0)	1(8.3)	0(0)	12
D 环区	42(38.5)	24(22.0)	22(20.2)	21(19.3)	109
氧化磷酸化复合物 组间比较 $\chi^2$ 值 10.24, $P=0.3312$ Complexes of oxidative phosphorylation system, compare within groups $\chi^2$ value 10.24, $P=0.3312$					
复合体 I (ND1~ND6) Complex I (ND1~ND6)	10(50.0)	5(25.0)	5(25.0)	0(0)	20
复合体 III (CytB) Complex III (CytB)	3(75.0)	1(25.0)	0(0)	0(0)	4
复合体 IV (COXI~III) Complex IV (COXI~III)	6(40.0)	4(26.7)	1(6.7)	4(26.7)	15
复合体 V (ATP6~8) Complex V (ATP6~8)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	4
突变类型 组间比较 $\chi^2$ 值 32.58, $P=0.0002$ Type of mutations, compare within groups $\chi^2$ value 32.58, $P=0.0002$					
碱基转换 Transition	54(51.4)	24(22.9)	20(19.0)	7(6.7)	105
碱基颠换 Transversion	2(22.2)	5(55.6)	1(11.1)	1(11.1)	9
插入突变 Insertion mutations	4(15.4)	10(38.5)	4(15.4)	8(30.8)	26
缺失突变 Deletion mutations	7(25.9)	5(18.5)	5(18.5)	10(37.0)	27
突变数目 Total number of mutations	67(40.1)	44(26.3)	30(18.0)	26(15.6)	167

### 3 讨论

mtDNA 异质性在人类细胞中并非是一种少见现象,正常人群中的异质性水平大约是 0.0148,线粒体遗传是遵循“瓶颈效应”模式,但异质性在亲代间的传递是非常复杂的。在正常个体间的异质性水平差异较大,即使是同卵双生子也可表现为不同的异质性水平<sup>[9~11]</sup>。既往在线粒体病的基因突变调查结果显示,多数病理性线粒体 DNA 突变通常为异质性的,而同质性的核酸碱基替换则以良性较多。

本研究中显示,在所有检测到线粒体基因体细胞性突变的 5 种肿瘤患者中,不论正常组织或是肿瘤组织均呈现一定的异质性,最高可达 65%,最低亦有 16%。总的转换形式主要以 Hm→Hm 和 Hm→Ht 为主,Ht→Hm 和 Ht→Ht 相对较少。肿瘤组织中

体细胞性突变异质性改变的原因我们考虑有以下原因,首先,由于线粒体基因缺乏组蛋白的保护,其错配修复机制缺陷,因此在肿瘤的无控制生长过程中,线粒体 DNA 大量复制需要反复解链,可能造成野生型和突变型线粒体 DNA 共存于同一细胞,或同一组织中包括上述两种类型的 DNA 的细胞共存,它可能是肿瘤起始和生长过程中的一种表现。其次,核基因组大约含有 1 000 个线粒体起源的序列(线粒体假基因),这些序列在现代人类起源之前已经转入核基因组,并与 mtDNA 具有很大的相似性<sup>[12]</sup>。核基因组的修复机制比较完善,已转入的部分线粒体起源的序列在核基因复制过程中比较稳定而不发生变异,而线粒体基因在进化过程或是肿瘤发生发展过程中由于缺乏组蛋白的保护而发生变异,因此,如果两种类型的 DNA 混合扩增时,可能导致异质性的出

现。第三,本研究中所获取的 DNA 并非来自单个肿瘤细胞,因此,也不能排除肿瘤块中的正常血管内皮细胞和其他正常细胞的污染。因此,未来的研究有必要利用激光微切片系统获取单个的肿瘤细胞或正常细胞进行对比分析加以阐明。

同样在我们的研究中也发现在部分 mtDNA 突变是由正常组织的异质性转化为肿瘤组织的同质性,其原因可能是:(1)突变的线粒体基因具有选择性复制优势,在肿瘤细胞的不断分化过程中替换了野生型线粒体基因,导致了已转化的细胞膨胀性生长。(2)单一的线粒体可控制其自身的复制,由于突变而具有功能缺陷的线粒体将过度复制,以增加其数目而补偿其功能的缺陷。

总之,本研究结果提示,线粒体 DNA 异质性是肿瘤患者的一种较为普遍的现象。此外,本研究还显示在不同基因区、呼吸链复合物基因的体细胞性突变的异质与同质状态的转换形式,主要以正常组织的同质性向肿瘤组织的同质性或异质性转移为主,而且碱基转换、颠换与缺失等不同类型的突变,其异质状态的转换形式也具有一定的差异。其原因尚不清楚,是否与不同突变的诱发因素而发生机制不同,是否这些转换形式与肿瘤的发生发展具有密切的关系有待进一步研究确定。

## 参考文献(References):

- [1] Rozwodowska M, Drewa G, Zbytniewski Z, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E, Maciak R. Mitochondrial diseases. *Med Sci Monit*, 2000, 6(4):817~822.
- [2] Schon E A. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci*, 2000, (25):555~560.
- [3] LIU Ling-Ling, TAN Duan-Jun, ZHAO Yu-Sheng, SHI Wei-Wei, Shields P, Wong L J C. Analysis of acquired mutations of oral mucosa cell mitochondrial DNA in smokers with lung cancer. *Chin J Clin Rehabilitation*, 2003, 7(15):2129~2131.
- [4] MAO Bao-Ling, CHEN Wei-Zhong, LI Shu-Ping, QIAN Gui-Sheng, HU Yi-De. Sequence feature analysis of mitochondrial DNA control region in human carcinoma cells. *Hereditas (Beijing)*, 1999, 21(4):1~5.
- [5] Tan D J, Bai R K, Wong L J C. Comprehensive Scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 2002, 62(4):972~976.
- [6] Welter C, Kovacs G, Seitz G, Blin N. . Alteration of mitochondrial DNA in human oncocyctomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1989, 1(1):79~82.
- [7] Chen T J, Boles R G, Wong L J. Detection of mitochondrial DNA mutations by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clin Chem*, 1999, 45(8):1162~1167.
- [8] Wong L J, Liang M H, Kwon H, Park J, Bai R K, Tan D J. comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin Chem*, 2002, 48(11):1901~1912.
- [9] Biousse V, Brown M D, Newman N J. De novo 14484 mitochondrial DNA mutation in monozygotic twins discordant for Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology*, 1997, 49(4):1136~1138.
- [10] Bendall K E, Macaulay V A, Baker J R. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet*, 1996, 59(6):1276~1287.
- [11] MU Y, Yan M, Shan X N. The study on relationship between mitochondrial genome polymorphism, heteroplasmic status and mitochondrial diseases. *Foreign Med Sci (Hereditas section)*. 2000, 23(2):108~111.
- [12] Kiechle F L, Zhang X, Malinski T. The molecular pathology laboratory of the 21st century. *Ann Clin Lab Sci*, 1999, 29(1):59~77.