

• 研究报告 •

人癌细胞线粒体 DNA 控制区序列特征分析¹

胡义德, 钱桂生, 李淑平, 陈维中, 毛宝龄

(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

摘要: 为了探讨癌细胞 mtDNA 控制区序列的变化特征, 采用 PCR 产物限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析与直接测序相结合的方法, 对比分析 6 株人癌细胞系、6 例癌患者及 4 例健康成人白细胞 mtDNA 控制区序列。发现第 16519 位 T→C、16534 位 A→G、46 位 T→G 和 49 位 A→C 突变, 在癌细胞系和癌患者白细胞 mtDNA 中分别占 50%(3/6) 和 33.3%(2/6), 健康成人白细胞 mtDNA 中未见此类型突变; 第 16278 位 C→T 突变, 在癌细胞系 mtDNA 中占 50%(3/6), 显著高于正常人群 mtDNA 中此位点的多态性变异。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。

关键词: 人癌细胞系; 线粒体 DNA; 控制区; 核苷酸序列; 突变

中图分类号: Q986; R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(1999)04-0001-05

Sequence Feature Analysis of Mitochondrial DNA Control Region in Human Carcinoma Cells

HU Yi de, QIAN Gui-sheng, LI Shu-ping, CHEN Wei-zhong, MAO Bao-ling

(Institute of Respiratory Diseases of People's Liberation Army, Xinqiao Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: To explore the sequence feature of mitochondrial DNA(mtDNA) control region in human carcinoma cells, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) and direct sequence techniques were used to analyze the sequence of mtDNA control region of 6 human carcinoma cell lines versus white blood cells which from 6 tumor patients and 4 normal adults. The T to C mutation at np 16519, A to G mutation at np 16534, T to G mutation at np 46, and A to C mutation at np 49 was found in 50% (3/6 cases) of carcinoma cell lines and in 33.3%(2/6 cases) of tumor patients, but it was not found in normal adults. The C to T mutation at np 16278 was found in 50%(3/6 cases) of carcinoma cell lines, it was significantly higher than that of the polymorphism of normal population. These findings suggest that the typical mutation in the starting area of heavy-strand replication and the first half of D-loop region might probably be associated with carcinogenesis or susceptibility of carcinoma.

Key words: Human carcinoma cell line; mtDNA; Control region; Nucleotide sequence; Mutation

人类线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的遗传信息显示自然界中少见的合理性与经济性。在仅

1. 收稿日期: 1998-06-22; 修订日期: 1998-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39500173)

作者简介: 胡义德, 男, 博士后, 现通讯地址: 上海医科大学博士后 94 号信箱, 邮编: 200032。

仅 16 569bp 长的基因组内, 定位了 2 种 rRNA、22 种 tRNA 和 13 种蛋白多肽基因。除 D 环(displacement loop)区以外, 在相邻的基因之间极少有非编码碱基。因此, 常把 D 环区第 16 024 至 575 位核苷酸之间的 1 120bp 片段称为控制区, 它负责整个 mtDNA 分子复制和转录的调控⁽¹⁾。mtDNA 分子游离于线粒体基质中, 缺乏组蛋白保护, 其损伤修复系统功能也不完善, 与核 DNA 相比, 它更容易受各种致癌物的攻击⁽²⁾。因此, 关于 mtDNA 损伤与突变在细胞癌变中的地位和作用机制研究已受关注⁽³⁾。我们前期的研究表明, 癌细胞 mtDNA 基因编码区序列非常稳定(另文报道)。为了进一步探讨线粒体遗传系统与细胞癌变之间的关系, 本文分析了癌细胞 mtDNA 控制区序列的变化特征。

1 材料与 方法

1.1 主要试剂

PCR 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶 *Hae*III(GG↓CC)和 *Eco*RV(GAT↓ATC) 均为德国宝灵曼公司产品。

1.2 人癌细胞系

选用 4 个肺腺癌细胞系即 SPC-A-1 (中国科学院上海细胞生物学研究所)、PLA-801D(解放军 301 医院)、A549 和 A531(美国), 1 个肝细胞癌细胞系 SMMC-7721(二军大), 1 个膀胱上皮癌细胞系 EJ(美国)。

1.3 临床资料

随机选择癌患者 8 例, 包括肺腺癌 3 例, 肺鳞癌 2 例, 食道和喉鳞癌各 1 例, 卵巢腺癌 1 例, 其中男性 7 例, 女性 1 例, 平均年龄 52.4 岁。健康成人 8 例, 其中男性 5 例, 女性 3 例, 平均年龄 51.1 岁。各抽取肝素抗凝静脉血 1ml 备用。

1.4 引物序列

引物 1: 5'-ATTCTAACCTGAATCGGAGG-3', 引物 2: 3'-TCTAATGTGTACGTTTCGTAG-5'。它们分别位于 mtDNA Cytb 和 12S rRNA 基因区内, 扩增包括 1 120 bp 控制区序列在内的 1 528 bp 片段。

1.5 mtDNA 模板的制备

癌细胞及外周血白细胞 mtDNA 的制备分别参见文献〔4, 5〕。

1.6 PCR 扩增及产物鉴定

PCR 扩增总体积为 100 μ l。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 35 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟结束。PCR 产物的鉴定参见文献〔4, 5〕。

1.7 PCR 产物酶切、电泳及图谱分析

每管取 15 μ l PCR 反应终产物, 加入 *Hae*III 或 *Eco*RV(5u), 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 4 小时, 于 2.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭), 6V/cm 恒压下电泳 2 小时, 紫外灯下观察并拍照。参照人 mtDNA 剑桥序列⁽⁶⁾ 进行酶切图谱分析。

1.8 PCR 产物直接测序

SPC-A-1 细胞 1 528bp 片段经纯化后, 测序引物同前, 在 ABI Prism377 型测序仪上, 采用双脱氧四色荧光染料标记法全自动测读序列。

2 结 果

2.1 mtDNA PCR 扩增

6 个癌细胞系 mtDNA 1 528bp 片段均呈阳性; 8 例癌患者白细胞中, 6 例阳性, 2 例阴性; 8 例健康成人白细胞中, 4 例阳性, 4 例阴性。

2.2 1 528bp 片段 *Hae*III 酶切

癌细胞组: A549、PLA-801D、EJ 3 个癌细胞系, 出现了 138bp、573bp、435bp、382bp(5' → 3') 共 4 个片段, 其酶切位点与人 mtDNA 剑桥序列相应区段 *Hae*III 酶切位点完全一致; 而 SPC-A-1、SMMC-7721、A531 3 个癌细胞系, 其 573bp 和 138bp 两个片段消失, 出现了 711bp 的新片段, 且 435bp 片段均消失, 凝胶上未能显示出其新的核酸片段。癌患者白细胞组: 在 1 528bp 片段阳性的 6 例中, 有 4 例的酶切格局与人 mtDNA 剑桥序列相应区段 *Hae*III 酶切格局相一致, 其余 2 例肺癌的 435bp 片段消失, 凝胶上未能显示出其新的核酸片段。健康成人白细胞组: 4 例阳性个体中, 1 528bp 片段经 *Hae*III 酶切格局与人 mtDNA 剑桥序列相应区段 *Hae*III 酶切格局完全一致(图 1)。

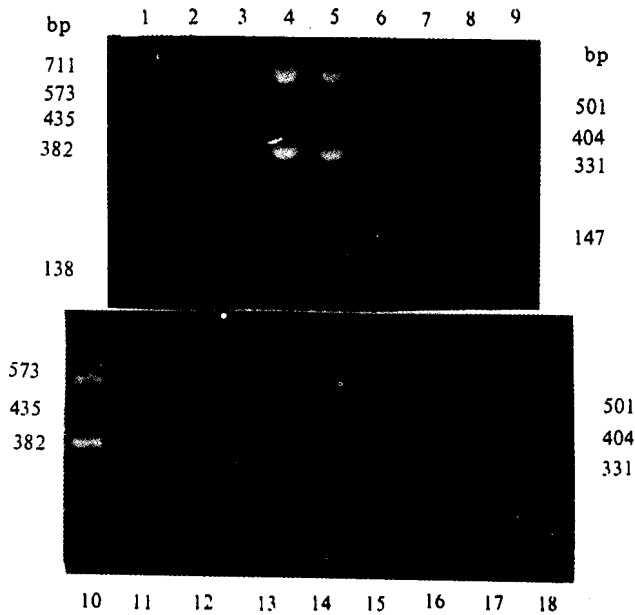


图 1 mtDNA 1 528 bp 片段 *Hae*III 酶切图谱

1. SPC-A-1; 2. PLA-801D; 3. A549; 4. SMMC-7721; 5. A531; 6. EJ; 7. 8. 10~13. 癌患者白细胞; 14~17. 健康成人白细胞; 9. 18. Marker.

2.3 1528bp 片段 *Eco*RV 酶切

在 SPC-A-1、A531、SMMC-7721 和 1 例健康成人白细胞 mtDNA 1 528bp 片段中出现了 1 个 *Eco*RV 的酶切位点, 将其分成 998bp 和 530bp 两个新片段。而其它癌细胞系、癌患者及健康成人白细胞 mtDNA 1 528bp 片段中未出现 *Eco*RV 的酶切位点, 与人 mtDNA 剑桥序列相应区段 *Eco*RV 酶切格局相一致(图 2)。

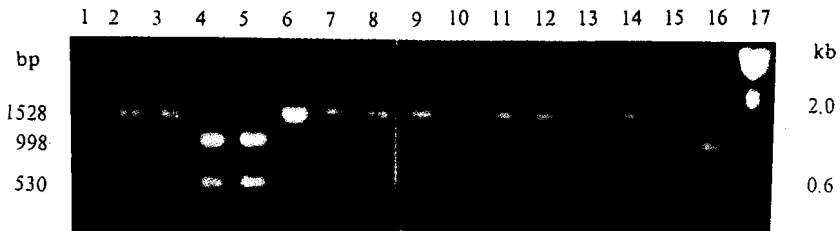


图 2 mtDNA 1 528 bp 片段 *Eco*RV 酶切图谱

1. SPC-A-1; 2. PLA-801D; 3. A549; 4. SMMC-7721; 5. A531; 6. EJ; 7~12. 癌患者白细胞; 13~16. 健康成人白细胞; 17. Marker.

2.4 SPC-A-1 细胞 1 528 bp 片段序列

共读出 1 462bp 长的序列, 其中含编码区序列 342bp, 全部控制区序列 1 120bp. 所得序列与人 mtDNA 剑桥序列相应区段的同源率为 97.3%(图 3).

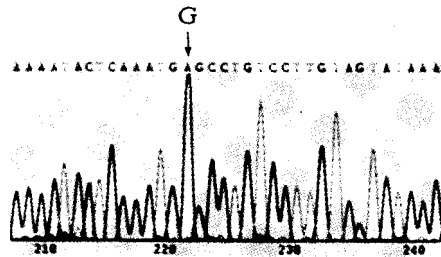


图 3 序列分析曲线图

箭头处为第 1 583 位核苷酸 G→A 突变

在 342bp 编码区序列中, 存在 3 个碱基突变, 突变频率为 0.88%。在 1 120bp 非编码区序列中, 存在 38 个碱基突变, 突变频率为 3.39%, 是编码区的 3.85 倍; 尤其在重链(H 链)复制起点(第 191 位核苷酸)及其相邻 D 环区(16 457→323)的 435bp 区段中, 出现了 28 个突变位点, 突变频率为 6.44%, 占整个控制区碱基突变总数的 73.7%, 并出现了多个 *Hae*III 切点(GGCC 序列)和 C→T 突变(表 1, 表 2)。

表 1 1 528bp 片段内碱基突变位点、性质、发生率¹⁾

突变位点	突变性质	酶切位点变化 (+/-, 出现/消失)	突变位点发生率		
			癌细胞系	癌患者白细胞	健康成人白细胞
15 883	G→A	第 15 884 位 <i>Hae</i> III(-)	3/6	0/6	0/4
16 278	C→T	第 16 276 位 <i>Eco</i> RV(+)	3/6	0/6	0/4
16 519	T→C	第 16 518 位 <i>Hae</i> III(+)	3/6	2/6	0/4
16 534	A→G	第 16 535 位 <i>Hae</i> III(+)	3/6	2/6	0/4
46	T→G	第 47 位 <i>Hae</i> III(+)	3/6	2/6	0/4
49	A→C	第 47 位 <i>Hae</i> III(+)	3/6	2/6	1/4

1) 以人 mtDNA 剑桥序列为基本序列, 并结合 PCR-RFLP 结果进行判断。

表 2 SPC-A-1 细胞 mtDNA 1528bp 片段内其它碱基突变位点及性质¹⁾

突变位点	突变性质	突变位点	突变性质	突变位点	突变性质
15 824	A→G	16 538	C→A	73	A→G
15 943	T→缺失	16 539	A→C	91	C→G
16 124	T→C	16 540	C→A	114	C→T
16 223	C→T	16 558	G→A	120	C→G
16 232	C→缺失	16 563	C→A	145	C→T
16 362	T→C	16 566	G→A	194	C→T
16 400	C→A	32	A→C	198	C→T
16 436	G→A	38	G→A	263	A→G
16 476	A→T	40	T→C	473	C→G
16 488	C→T	42	T→缺失	480	C→G
16 489	T→G	61	C→T	484	A→T
16 499	A→缺失	64	C→T		

1) 以人 mtDNA 剑桥序列为基本序列。

3 讨 论

关于人类 mtDNA 控制区结构、功能改变与疾病关系的研究在国内外报道甚少。

本研究发现, SPC-A-1 细胞 mtDNA 部分编码区碱基突变率为 0.88%, 与 Raymond 等⁽⁷⁾ 报道的正常人群 mtDNA 平均变异率 0.9% 相比, 无显著差异。其中第 15 883 位核苷酸 G→A 突变为多态性变异⁽⁸⁾。PCR 结果显示, 癌细胞系 mtDNA 1 528bp 片段阳性率为 100%, 较白细胞组成功率明显增高, 表明癌细胞 mtDNA 引物区序列更保守。此结果进一步证明癌细胞 mtDNA 编码区一级结构非常稳定。

SPC-A-1 细胞 mtDNA 控制区碱基突变率为 3.39%, 是编码区的 3.85 倍; 此结果与 Cann 等⁽⁸⁾ 报道的正常人群 mtDNA 控制区存在 3% 变异率相比, 相差不显著。但值得注意的是, 在 H 链复制起点及其相邻的 D 环区, 出现了 28 个突变位点, 其突变率为 6.44%, 占整个控制区碱基突变总数的 73.7%。因此, 癌细胞 mtDNA 控制区中的 435bp 区段可能是一高变区。从突变性质看, 在高变区中有 80% 的突变为新发现的突变, 尤其在第 16 519 位 T→C、16 534 位 A→G、46 位 T→G 和 49 位 A→C 的突变, 使该区段内出现了 3 个 GGCC 序列。因此, 在使用 *Hae*III 酶切 1 528bp 片段后, 435bp 片段被裂解成 4 个小片段而在凝胶上不能显示。由此可见, PCR-RFLP 分析与 PCR 产物直接测序结果完全吻合。结合 1 528bp 片段 *Hae*III 酶切分析结果判断, 在 6 个癌细胞系中, 3 个细胞系存在 435bp 片段消失, 占 50%; 在 6 例癌患者白细胞中, 2 例肺癌患者白细胞 mtDNA 也存在此类型突变, 占 33.3%; 而 4 例非癌患者白细胞 mtDNA 中均未发现此类型突变。文献中亦未见类似变异的报道⁽³⁾。此外, 第 16 278 位核苷酸 C→T 突变在第 16 276 位出现了 *Eco*RV 的新切点。此突变在 6 个癌细胞系中占 50%。此比例显著高于正常人群 mtDNA 中此位点的多态性变异(2%)^(8,9)。所以, 此突变在癌细胞 mtDNA 中也具有一定代表性。结果表明, 癌细胞和癌患者白细胞 mtDNA H 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。

研究发现, 癌细胞 mtDNA 的拷贝数显著增加, 表明癌细胞 mtDNA 产生了复制失控现象, 其机制尚未阐明⁽¹⁰⁾。本实验发现, SPC-A-1 细胞 mtDNA H 链复制起点区域存在 6 个 C→T 突变, 此突变将降低该区的 GC 含量, 削弱 mtDNA 复制起点区域双链之间的结合力, 从而更容易启动 mtDNA 复制。因此, 癌细胞 mtDNA 控制区中过多的 C→T 突变, 可以部分解释癌细胞 mtDNA 复制失控现象, 其生物学意义有待深入研究。

参 考 文 献:

- (1) Hao H. Functional and structural features of a tandem duplication of the human mtDNA promoter region[J]. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60: 1363~1372.
- (2) Olivero O A. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA[J]. *Mutat. Res.*, 1997, 391: 79~86.
- (3) Bianchi M S, Bianchi N O, Bailliet G. Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients[J]. *Cytogenet Cell Genet.*, 1995, 71: 99~103.
- (4) 胡义德, 钱桂生, 陈维中, 等. 一步法快速制备培养细胞线粒体DNA[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14: 250~251.
- (5) 胡义德, 钱桂生, 陈维中, 等. 人白细胞线粒体DNA的快速分离与鉴定[J]. *中华血液学杂志*, 1997, 18: 605~606.
- (6) Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290: 457~465.
- (7) Raymond J M, Maxwell C L, Lawrence A L. Nucleotide sequence preservation of human leukemic mitochondrial DNA[J]. *Cancer Res.*, 1985, 45: 1809~1814.
- (8) Cann R L, Willson A C. Length mutations in human mitochondrial DNA[J]. *Genetics*, 1983, 104: 699~711.
- (9) 晋华黔, 吴立甫, 王文, 等. 贵州汉族、苗族、布依族和水族人群线粒体DNA多态性研究[J]. *遗传学报*, 1995, 22: 1~4.
- (10) Vijay A V, Chaistopher M C, Karen L A, *et al.* Non-isotopic *in situ* hybridization method for mitochondria in oncocytes[J]. *J. Histochem Cytochem.*, 1994, 42: 273~276.