

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)13-1188-03

银染 PCR-SSCP 方法检测大肠癌组织线粒体 DNA 的突变

阎丽, 肖冰, 宋卫兵, 耿炎, 赖卓胜 (南方医科大学南方医院消化病研究所, 广东广州 510515)

Mutation analysis of mitochondrial DNA in colorectal carcinoma tissues by silver-staining PCR-SSCP

YAN Li, XIAO Bing, SONG Wei-Bing, GENG Yan, LAI Zhuo-Sheng

Institute of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 AIM: To analyze the mutations of mitochondrial DNA in colorectal carcinoma tissues. **METHODS:** Silver-staining Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) technique and sequence analysis were used to detect the point mutation changes on the D-loop region in mitochondrial DNA in 40 colorectal carcinomas together with the adjacent normal tissues. **RESULTS:** Among the 40 colorectal carcinomas, point mutations were found in 7 colorectal carcinoma tissues with the mutation rate of 18% (7/40). Among the 9 point mutations, 3 point mutations were found in a colorectal carcinoma of Dukes' stage D and the other 6 point mutations were found in 6 colorectal carcinomas of Dukes' stage C. C to T mutation at np498 and at np16298 were found in 7 colorectal carcinomas with point mutations. **CONCLUSION:** A certain degree of point mutations is found in the D-loop region of mitochondrial DNA in colorectal carcinoma tissues, and the occurrence of mutations may be associated with colorectal carcinoma susceptibility and malignant grade, but whether the mutations have carcinogenicity needs further study.

【Keywords】 colorectal carcinoma; mitochondrial DNA; D-loop; mutation

【摘要】目的: 研究大肠癌组织线粒体 DNA 的突变情况。方法: 用银染 PCR-SSCP 技术结合测序的方法检测 40 例大肠癌组织及其癌旁正常组织的线粒体 DNA D-环区的点突变情况。结果: 40 例大肠癌组织中检测到 7 例点突变改变, 突变率为 18% (7/40), 在检测的 9 个突变位点 3 个突变位点存在于 Dukes D 期的 1 例大肠癌中, 其他 6 个突变位点分别存在于 Dukes C 期的 6 例大肠癌组织中, 其中 498 位 C→T, 16298

位 C→T 两个突变位点在检测到点突变的 7 例大肠癌组织中均检测到。结论: 大肠癌组织线粒体 DNA D-环区存在一定程度的点突变, 突变的发生可能与大肠癌的易感性和恶性程度有一定相关性, 但是否是大肠癌的发病机制尚有待进一步研究。

【关键词】 大肠癌 线粒体 DNA D-环区 突变

【中图分类号】 R735.34 **【文献标识码】** A

0 引言

目前认为肿瘤的生物学特征不仅取决于核内遗传物质, 与核外线粒体 DNA 的改变也有非常重要的关系^[1-2]。国内外多项研究发现线粒体 DNA 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^[3-4]。为了进一步研究大肠癌组织线粒体 DNA 的 D-环区是否存在共性的突变位点, 并探讨这些共性的突变位点是否与大肠癌的发生机制有一定相关性, 我们用银染 PCR-SSCP 技术结合测序的方法对 40 例大肠癌组织及对应的癌旁正常组织的线粒体 DNA 的 D-环区进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-10/2004-05, 经南方医科大学南方医院手术切除证实为大肠癌患者的组织标本 40 (男 22, 女 18) 例, 年龄 32 ~ 75 (平均 53.6) 岁, Dukes' 分期 B 期 6 例, C 期 28 例, D 期 6 例。线粒体 DNA 提取试剂盒购自杭州 V-gene 公司; 2 × Pfu PCR MasterMix 一管便捷式 PCR 扩增试剂盒购自清华大学天为时代公司, 银染 PCR-SSCP 试剂购自广州威佳生物试剂公司。

1.2 方法 按照线粒体 DNA 提取试剂盒上的步骤提取 40 例大肠癌及癌旁正常组织的线粒体 DNA, 根据大肠癌线粒体 DNA D-环区的全长设计四对引物, 分别为引物 1: 5'-GATCACAGGTCTATCACCTATTA-AC-3', 引物 2: 5'-GGTTTGGCAGAGATGTGTTTA-3' 扩增 355 bp 的片段, 引物 3: 5'-GCTTCTGGCCACAG-CACTTA-3', 引物 4: 5'-GCCCCGTCTAAACATTTTCAG-3' 扩增 313 bp 的片段, 引物 5: 5'-CTTTCATGGG-GAAGCAGATT-3', 引物 6: 5'-TGTTGGTATCCTAGT-GGGTGA-3' 扩增 258 bp 的片段, 引物 7: 5'-CTATCA-

收稿日期 2005-10-11; 接受日期 2005-12-06

通讯作者: 肖冰. Tel (020) 61641530 Email xiaobing@fimmu.com

作者简介: 阎丽. 主治医师. Tel (029) 84775229 Email yanlidalian@hotmail.com

CACATCAACTGCAACTC-3',引物 8 5'-CATCGTGAT-GTCTTATTTAAGG-3' 扩增 342 bp 的片段,根据四对引物用 PCR 仪扩增线粒体 DNA D-环区的全长。

成功扩增后取 10 μ L PCR 产物,加入 8 μ L 变性缓冲液(800 g/L 去离子甲酰胺,20 mmol/L EDTA,0.5 g/L 溴酚蓝,0.5 g/L 二甲苯晴蓝)混匀,96 $^{\circ}$ C 变性 10 min,冰上骤冷,立即上样行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺=29)0.5 \times TBE 为电泳缓冲液,10 mA 恒电流电泳 5 h,直至溴酚蓝接近凝胶底部为止,取出凝胶,固定、银染、显色、摄片。

将检测到突变的大肠癌的 PCR 片段纯化,经上海博亚生物技术有限公司进行测序后,将测序结果与基因数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)的大肠癌线粒体 DNA D-环区的序列进行比对分析。

2 结果

2.1 线粒体 DNA D-环区扩增与电泳 依据设计的四对引物成功扩增了大肠癌线粒体 DNA D-环区全长序列,其中引物 3 A 与引物 7 B 扩增的大肠癌线粒体 DNA D-环区序列如图 1A、B 所示。

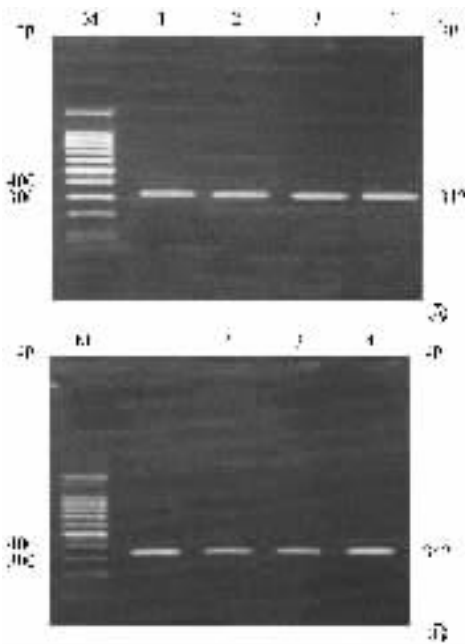


图 1 引物 3 A 扩增的 mtDNA D-环区 PCR 产物电泳图(312 bp);B 引物 7 B 扩增的 mtDNA D-环区 PCR 产物电泳图(342 bp)。

图 1 引物 3 A 与引物 7 B 扩增的 mtDNA D-环区电泳图

2.2 银染 SSCP 检测 将扩增的大肠癌和癌旁正常组织的线粒体 DNA D-环区的 PCR 产物行银染 SSCP 检测,结果发现 7 例大肠癌组织存在点突变,突变率为 18%(7/40),突变位点分别存在于引物 3 A 和引

物 7 B 扩增的 mtDNA D-环区的 PCR 片段中,其中在引物 3 A 扩增的 PCR 片段中检测到的 2 处点突变,如图 2A、B 所示。

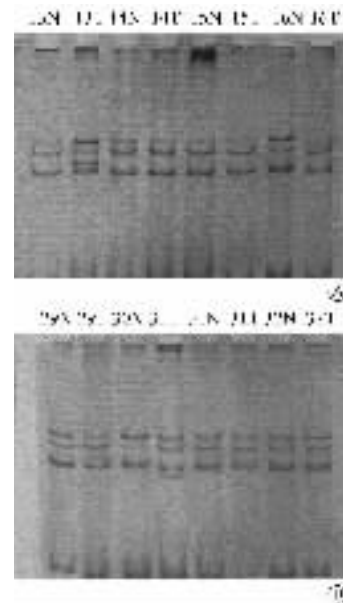


图 2 引物 3 A 扩增的 PCR 片段银染 SSCP 结果图
A 13N、13T、14N、14T、15N、15T、16N、16T 的 SSCP 结果提示 13T 发生点突变;图 B:29N、29T、30N、30T、31N、31T、32N、32T 的 SSCP 结果 30T 发生点突变。

图 2 引物 3 A 扩增的 PCR 片段银染 SSCP 结果图

2.3 线粒体 DNA D-环区的突变 SSCP 阳性的大肠癌组织的 PCR 扩增片段进行测序,结果发现 498 位 C \rightarrow T,16298 位 C \rightarrow T 这两个突变位点在所有 SSCP 阳性的 PCR 扩增片段中均检测到,其他突变位点为无规律随机突变的位点。

3 讨论

线粒体 DNA 作为细胞核外的遗传物质与核基因一起制导呼吸链,其任何类型的突变都可能对细胞功能产生重要而深远的影响,目前国内外多项研究均已证实多种实体肿瘤中存在着线粒体 DNA 的突变,但这种突变与肿瘤发生发展的关系还不十分清楚。

有关大肠癌组织线粒体 DNA 突变的研究国内尚未有人报道,国外虽有报道但意见不一,其中 Habano 等^[5-6]在对 45 对结肠癌和正常组织的线粒体 DNA 的研究中,发现有 7/45(16%)存在突变。Hibi 等^[7]检查了 77 例大肠癌患者大肠癌细胞及其相对应的血清中线粒体 DNA 的 D-环区改变,结果发现 7 例患者大肠癌细胞的线粒体 DNA 发生了突变,但突变发生的病理机制尚不清楚,本实验用银染 PCR-SSCP 方法检测了 40 例大肠癌和癌旁正常组织线粒体 DNA D-环区点突变改变,结果发现 40 例大肠癌组织中有 7

例检测到点突变,突变率为 18%(7/40),与国外文献报道的大肠癌组织该区的突变频率基本类似,但本研究对检测到点突变的 PCR 片段进行测序分析时发现突变的大肠癌组织中均存在 498 位 C→T,16298 位 C→T 这两个相同的突变位点,与本课题组在 4 株大肠癌细胞株中检测到的共性突变位点相类似^[8],这些共性的突变位点在国外还未见有人报道过,考虑为一种特征性的改变,这种特征性的改变可能和大肠癌的易感性有关,结合所取大肠癌组织标本的 Dukes 分期发现,检测到的突变位点分别存在于 Dukes C 期和 Dukes D 期的大肠癌组织中,而在 Dukes B 期的大肠癌组织中未检测到,可见大肠癌组织线粒体 DNA D-环区的点突变改变可能也与大肠癌组织的恶性程度有一定的相关性,即恶性程度越高的大肠癌组织可能存在着较高度度的点突变。

线粒体 DNA 突变在肿瘤发生和发展中作用与机制的研究还刚刚起步,通过对大肠癌组织线粒体 DNA D-环区的研究,我们不难发现大肠癌组织中确实存在着一定程度的点突变改变,但这些改变是否是伴随着癌变发生而出现的特征性改变,是否与大肠癌发病机制相关以及能否为临床提供一种新型早期诊断大肠癌的肿瘤标志物,还须进行进一步研究。

【参考文献】

[1] Allen M, Andreasson H. Mitochondrial D-loop and coding sequence

analysis using pyrosequencing [J]. *Methods Mol Biol* 2005 297 : 179 - 196.

[2] Yoneyama H , Hara T , Kato Y , et al . Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells [J]. *Mol Cancer Res* 2005 3 (1) 14 - 20.

[3] Wheelhouse NM , Lai PB , Wigmore SJ , et al . Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver [J]. *Br J Cancer* 2005 , 92 (7) 1268 - 1272.

[4] Pejovic T , Ladner D , Intengan M , et al . Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma [J]. *Eur J Cancer* 2004 , 40 (16) 2519 - 2524.

[5] Habano W , Sugai T , Yoshida T , et al . Mitochondrial gene mutation , but not large-scale deletion , is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability [J]. *Int J Cancer* , 1999 , 83 (5) 625 - 629.

[6] Habano W , Nakamura S , Sugai T . Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas : evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome [J]. *Oncogene* , 1998 , 17 (15) 1931 - 1937.

[7] Hibi K , Nakayama H , Yamazaki T , et al . Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients [J]. *Int J Cancer* , 2001 94 (3) 429 - 431.

[8] 阎丽,肖冰,赖卓胜. 线粒体 DNA 变异在大肠癌发病中的作用与机制研究 [J]. *中华消化杂志* , 2005 25 (6) 376 - 377.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)13-1190-01

腰椎管内硬膜外血肿 1 例

侯明明,孙振林,于维良

(哈尔滨医科大学附属第四医院骨科,黑龙江 哈尔滨 150001)

【关键词】血肿 腰椎管内硬膜外

【中图分类号】R739.42 【文献标识码】B

1 病历报告 男性 51 岁,哈尔滨人,于 2005-02-22 以“左下肢疼痛,麻木 2 mo”入院。2 mo 前无明显诱因出现左下肢麻木、疼痛,X 线未见异常,在神经内科给与对症治疗无好转,腰椎 MRI 见 L₄₋₅椎管内占位性病变,遂转我科。查体:一般状况可,跛行,脊柱正常生理弯曲,活动无受限。L₄₋₅、骶₁左侧椎旁叩击痛(+)。肛门反射消失,双侧提睾反射消失,左侧臀部、大腿后侧及前外侧、小腿内侧感觉减退,双下肢肌力 5 级,双侧膝腱反射和跟腱反射消失,双下肢直腿抬高 80°,加强试

验(-),未引出病理反射。MRI 示 L₄ 椎体水平椎管内 1.8 cm × 1.2 cm × 1.0 cm 的 T₁ 略低于 T₂ 的信号影。初诊为腰椎管内肿瘤。X 线、B 超、ECT 均未见异常。双下肢肌电图示胫后神经腓窝—踝运动传导速度减慢,远端及近端运动潜伏期显著显著延长。双下肢胫后神经感觉功能电位未引出,提示周围神经损伤肌电图。于入院后第 3 日在 EA + SA 行腰椎减压、肿瘤切除术。术中见肿瘤黏附于硬膜外,大小约为 4.0 cm × 1.5 cm,质软,暗紫色,边界清楚,未向神经根及椎体延伸侵蚀,粘连不重。轻剥后从硬膜外脱落。切开肿瘤见断面为分叶状。术后常规给与抗炎、脱水治疗,2 d 即感麻木症状减轻。病理报告:陈旧性血块,周围有机化。于 2 wk 后拆线出院。

2 讨论 椎管内肿瘤常见,可分为髓内、髓外硬膜下和髓外硬膜外肿瘤。本例患者术前曾在科内会诊讨论,因 X 线、B 超、CT 和 ECT 检查,均未发现原发灶,见于 MRI 上一占位性病变,故以髓外硬膜外恶性肿瘤可能性大。术中见肿块附于硬膜外偏后侧,界限清楚,未向椎体、椎弓根及肋骨侵蚀,故排除其恶性的可能,且病理诊断为陈旧性血块。经过仔细问病史,患者于 3 mo 前工作中有外伤史,休息 2 d 后症状消失。我们认为,在外科疾病的诊断和治疗中应仔细询问病史,掌握疾病的发生发展,才能做出正确诊断,避免误诊。

编辑 何扬举

收稿日期 2005-09-08; 接受日期 2006-01-12

作者简介:侯明明,硕士生,住院医师。Tel:13895754702 Email:

herodoc@126.com