

线粒体 DNA 与肿瘤发生的关系

黄 勇 综述,陈家堃 吴中亮 审校

(广州医学院化学致癌研究所,广东 广州 510182)

【摘要】 人类线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是个双链闭环分子,共有 16 569 个碱基对,含有 37 个基因,其中 13 个基因是编码与细胞氧化磷酸化有关的蛋白多肽。在各种因素作用下 mtDNA 比核 DNA 更易产生结构和功能上的改变,并可导致多种疾病发生。近年来很多人类疾病的 mtDNA 突变位点已被确定,还有很多实验表明 mtDNA 参与了细胞癌变过程。本综述主要涉及各种因素引起的与肿瘤有关的 mtDNA 多种结构和功能改变,以探讨 mtDNA 损伤与突变在肿瘤发生过程中的可能作用机制。

【关键词】 线粒体 DNA; 肿瘤; 氧化损伤

中图分类号: R730.210; Q754

文献标识码: A

线粒体(mitochondria)作为真核生物的能量代谢中心早已被认定,但直到 1963 年 Nass 在鸡卵母细胞中才第一次发现线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。那时 mtDNA 与疾病及肿瘤的关系并没有引起人们的重视。到了 80 年代,发现许多疾病与 mtDNA 有关后,人们对 mtDNA 的研究日益深入广泛。本文就以下几个方面对 mtDNA 与肿瘤发生的关系做一综述。

1 线粒体 DNA 的结构

mtDNA 存在于线粒体内。线粒体是高等动物细胞内除核外唯一含有 DNA 的细胞器,是进行氧化磷酸化反应并为细胞提供能量的主要场所。人类 mtDNA 的全部核苷酸序列分析已由剑桥分子生物学研究所的 F. Sanger 实验室完成¹。mtDNA 呈闭环双链,全长 16 569 bp,含有 37 个基因,2 个为 rRNA 基因,22 个为 tRNA 的基因,另外 13 个是与线粒体氧化磷酸化有关的蛋白质基因,这 13 个基因产物与核 DNA 编码的蛋白质共同组成呼吸链复合物。mtDNA 还有一段非编码区,即 D 环(D-LOOP),其位置在 16 028 np ~ 577 np,占全部 mtDNA 的 6%左右,主要是调控 mtDNA 的转录和复制²。

2 mtDNA 在肿瘤组织中的改变

2.1 肿瘤组织中 mtDNA 结构的改变

mtDNA 在许多肿瘤中都发生了改变。Habano 等第一个报道了结肠直肠癌患者中线粒体基因组的 D 环微卫星不稳定性(MSI),比例高达 44%。他们又分析了 45 例结肠直肠癌患者整个 mtDNA,扩增、酶切、电泳后未发现有改变,但经 SSCP 分析有 7 例患者 NADH 脱氢酶基因发生了改变(16%),7 例中有 6 例表现出 D 环(C)_n 的微卫星不稳定性。Habano 还研究了胃癌患者的 8 个编码基因和 D 环非编码的(C)_n 序列,发现有 mtMSI 及 ND(ND1, ND5)基因的突变^{3~5}。Tamura 等在 45 例胃癌患者的 mtDNA 中发现了一个碱基转换和一个单核苷酸缺失。Maximo⁶ 等则在胃癌患者 mtDNA 中发现了大片断缺失,他们在 32 个胃癌患者中检测到 17 个患者发生了 4 977 bp 的缺失,缺失的发生率为 17/32(53%),远高于 Tamura 报道的点突变的发生率 2/45(4.4%)。Burgart 等在胃癌患者 mtDNA 的 D 环中发现了一个 50 bp 的缺失,但发生率比较低⁷。这些提示胃癌患者主要表现为 mtDNA 的大片断缺失而不是点突变。

Richard 等分析了 40 例乳癌患者 mtDNA 中起始于 514 bp 的微卫星(CA)_n,还用内切酶 Mnl 分析了位于 16 108 ~ 16 420 bp 的序列,17 例(42.5%)表

收稿日期:2001-11-02; 修订日期:2002-01-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:39170651);

作者简介:黄 勇(1975-),男,安徽淮南人,在读硕士,研究方向:分子毒理学。

现出微卫星不稳定性, 19 例患者的 Mnl 酶切位点发生突变。他们认为产生 mtRFLP 及 mtMS 有两个主要机制: 自由基损伤以及聚合酶的错误修复⁸。Bianchi 等也在乳癌患者的肿瘤组织中发现了一些点突变和缺失。在其他一些肿瘤中也发现过 mtDNA 的突变, 如在肾细胞癌患者癌组织中发现了 mtDNA 的 ND1 亚单位上有一个 264 bp 的缺失⁹。

以上所说的均为实体肿瘤, 在血液系统肿瘤中也发现了很多异常。Clayton 等在白血病人白细胞的 mtDNA 中发现了一些特殊结构, 如由两个闭合环状 mtDNA 分子组成的环状二聚体。这种结构被认为在白血病的发病中起一定的作用。作者后来又观察了 14 例白血病患者, 发现所有病人的白细胞中均有环状二聚体结构。随着化疗药物运用, 病人中的环状二聚体所占比例逐渐降低, 这提示白血病的严重程度可能与环状二聚体的多少有关¹⁰。

2.2 肿瘤组织中 mtDNA 基因表达及线粒体和 mtDNA 数量的改变

肿瘤组织中 mtDNA 的基因表达也有异常。Lu 等发现人结肠癌细胞系 HT-29 细胞 mtDNA 中的 ND4、ND4L、Cytb、COX、ATPase6 和 8 以及 16srRNA 的转录水平平均高于正常细胞¹¹。Chester 等发现结肠癌肿瘤组织中 ND2 表达水平明显高于正常组织。Luciakova 等发现鼠肝癌细胞 mtDNA 中 ND2、细胞色素氧化酶(COX)、亚基转录水平比正常细胞升高了 5 倍²²。Corral 等在化学诱导的鼠肝癌细胞中检测到 ND5、COX 及 16srRNA 的转录水平均比正常肝细胞中的高。LaBiche 等研究发现转移的淋巴瘤细胞中 mtDNA 的 ND5 基因表达比非转移淋巴瘤细胞中的高, 作者认为 ND5 的表达升高可能有利于肿瘤转移¹³。Sharp 等¹⁴发现在恶性乳腺癌组织中复合物 COX mRNA 的表达有显著升高, 并且 COX 表达越高则恶性肿瘤的分化程度就越低。与肿瘤发生相反, 衰老过程中 mtDNA 转录水平降低, 而线粒体数目却升高。这可能是 mtDNA 转录水平降低的一种代偿, 但这种代偿并不成功。在肿瘤细胞中也发现有 mtDNA 基因表达降低的, 如 Heerdt 等发现结肠癌组织中编码细胞色素 C 氧化酶亚单位(COX)的基因表达降低¹⁵。目前还不清楚基因表达异常的调控机制。除了在结构和功能上有变化外, 肿瘤细胞的线粒体和 mtDNA 在数量上也发生了改变。如在白血病人的白细胞及神经胶质瘤细胞中均发现 mtDNA 的拷贝数有不同程度的增

加^{16,17}, 在鼠肝癌细胞中则发现线粒体的数目减少¹²。

2.3 肿瘤组织 mtDNA 转录和复制调控区域 D 环的改变

mtDNA 的 D 环中含有重链和轻链启动子以及重链的复制起始位点, mtDNA 的拷贝及基因表达异常可能与其突变有关。Heerdt 等¹⁸针对这一问题研究了 24 例结肠癌患者 mtDNA 中 D 环第 371~570 的序列(含有重链和轻链启动子), 没有发现基因突变, 仅发现了几个多态性位点。原发性甲状腺癌中 mtDNA 突变率可达到 23%, 却没有一例发生在 D 环上¹⁹。所以线粒体基因表达降低可能由于线粒体转录因子的合成或调节改变, 也可能是线粒体基因表达的转录后调控改变。Alonso 等则在胃癌及结肠直肠癌患者的 mtDNA D 环中均发现有突变。Ivanova 等发现白血病人的 mtDNA 序列与正常人相比其非编码区即 D 环存在明显的差异。Fliss 等对膀胱癌、头颈癌以及肺癌患者体液中 mtDNA 进行研究, 扩增了 80% mtDNA 序列, 分析发现 3 种癌的突变率分别为 64%、46% 和 43%, 突变主要集中在 D 环和 ND4 基因²⁰。可见肿瘤细胞中 D 环的突变虽然存在但并不普遍。

2.4 肿瘤组织中 mtDNA 在 nDNA 中的整合

mtDNA 能以多种方式产生游离片段进入细胞核与 nDNA 整合, 有人提出 mtDNA 的插入可能是原癌基因激活的一个机制。在肿瘤细胞中也发现了许多整合现象。Shay 等²¹在 HeLa 细胞中发现细胞核 c-myc 基因组内有细胞色素 C 氧化酶亚单位(COX)的同源序列。Naohisa Kamimura 等²²则在肿瘤细胞的 nDNA 中发现了一段 mtDNA 的同源序列, 这一段是由 mtDNA 上 3 段不相连的基因 12srRNA、细胞色素氧化酶(COX)及 ND4L/ND4 中的一部分 DNA 相连接组成, 后来 Shay 和 Werbin 也得到了类似的研究结果。通过整合, mtDNA 片段可能会激活癌基因或使抑癌基因失活, 进而使细胞增殖分化异常, 最终可能导致细胞癌变。

2.5 来源于肿瘤细胞的无 mtDNA 细胞致癌性的改变

有学者对无 mtDNA 的细胞的生物学性状进行了研究。来源于人成胶质细胞瘤和乳癌细胞的 rho⁰(无线粒体)细胞丧失了独立锚附生长能力, 但在注入正常的含 DNA 的线粒体后又可恢复这种能力²³。rho⁰HeLa 细胞丧失了其对裸鼠的皮下致瘤能力, 在

注入正常人成纤维细胞的 mtDNA 后,可恢复其致癌性²⁴。这从一个侧面说明 mtDNA 与肿瘤发生确实有一定关系。

3 mtDNA 损伤在肿瘤发生中的作用

3.1 mtDNA 与致癌物的结合

mtDNA 缺乏组蛋白和 DNA 结合蛋白的保护,并且线粒体内脂肪/DNA 的比值很高,因而 mtDNA 易于和致癌物尤其是嗜脂性致癌物结合,许多实验都支持这一观点。Allen 等以 6 种不同的多环芳香族化合物对细胞进行染毒,发现每种化合物与 mtDNA 的结合量都远高于与细胞核 DNA (nDNA) 的结合量,有几十到几百倍之多。吸烟者与不吸烟者相比其支气管上皮细胞中 mtDNA 比 nDNA 受到的损伤更大,这可能与香烟烟雾中的化学物易与 mtDNA 结合有关²⁵。

3.2 mtDNA 的氧化损伤

mtDNA 与氧化磷酸化场所相距甚近,直接暴露于氧化磷酸化过程产生的高反应性氧中,因此易受到氧化损伤而发生突变,但是研究结果并不一致。Richter 曾报道线粒体代谢的氧大约有 1%~2% 转变为 O₂,每天线粒体产生的 O₂ 可达 10⁷ 个分子。正常组织中 mtDNA 的氧化损伤指标之一 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHDG)水平是 nDNA 的 16 倍。Yakes 等研究认为暴露于 ROS(活性氧)的细胞其 mtDNA 与 nDNA 相比损伤更广泛,持续时间也更长²⁶。肿瘤细胞中 mtDNA 发生突变与肿瘤细胞内有高水平的超氧化物和氢过氧化物这一情况是相吻合的,这可能是由于线粒体 DNA 缺乏内含子,各种原因引起 mtDNA 突变后可致编码基因异常,进而导致呼吸链异常并使 ROS 增加,ROS 又可导致新的突变发生。不论哪种情况先发生,都将形成恶性循环,产生一个持续的高氧环境,这个环境有助于肿瘤的发生。很多研究者对 mtDNA 的氧化损伤指标 8-OHDG 进行了测定,其结果高低不等,相差悬殊。Beckman 等对这一问题进行了分析,列举了正反两方面的资料,他认为 mtDNA 比 nDNA 更易产生氧化损伤的假说缺乏有力的依据²⁷。

mtDNA 受到损伤后虽然具有一定的修复能力,但其能力远比不上 nDNA,如 mtDNA 就缺乏嘧啶二聚体的修复机制。动物腹腔内注射黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 后其为肝细胞 mtDNA 结合产生的加合物可持续存在 24h,而与 nDNA 产生的加合物此时已经被

清除完了²⁸,这也反映了其损伤修复能力有限。

4 mtDNA 与 nDNA 的相互作用

mtDNA 本身不能产生导致肿瘤发生或产生抑制肿瘤发生的蛋白质,在肿瘤发生过程中 mtDNA 应该是与 nDNA 共同发挥作用。核基因组可在复制、转录、RNA 加工和翻译水平上对线粒体基因表达进行调控,因为在这些过程中所需的一些活性物质都是由核基因组编码的。线粒体对核基因也有反馈调节作用。如肿瘤细胞中糖酵解的第一个酶己糖激酶活性升高²⁹,这可能是 ATP 合成障碍的一种代偿。在白血病细胞(HL60)中,ATP 水平少量减少可诱导细胞在 G1 期的累积;如 ATP 大量减少则可诱导细胞在 G2 期的累积³⁰。Davis 发现低水平的氢过氧化物可刺激多种细胞的有丝分裂³¹。这些说明 ROS 异常改变或 mtDNA 发生突变都可能影响 ATP 的生成,进而对细胞周期及一些酶活性产生影响。肿瘤中 nDNA 改变后也可通过对 mtDNA 的调节作用影响 mtDNA 的基因表达。

5 小结

到目前为止产生了很多 mtDNA 损伤可导致肿瘤发生的假说,如 ROS mtDNA 突变 肿瘤发生, mtDNA 片断插入核 DNA 导致肿瘤发生,损伤的 mtDNA 具有复制优势并在子代中累积达到其发病阈值进而导致肿瘤发生,等等。目前还没有找到 mtDNA 与肿瘤发生有直接关系的有力证据,不过很多实验都表明 mtDNA 至少参与了致癌过程。由于 mtDNA 含有的基因数量少,并且不含有原癌基因或抑癌基因,因而 mtDNA 基因改变可能不具有独立致癌的能力,它应该是和 nDNA 相互作用导致肿瘤发生的。今后可重点研究 mtDNA 与 nDNA 之间信号传导的细节,特别是 mtDNA 损伤后其与 nDNA 之间的信号传导过程及可能产生的后果,这可使人们更深入的认识肿瘤的发生发展机制。

参考文献:

- 1 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome J. *Nature*, 1981, 290(5806): 457~465.
- 2 Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8739~8746.
- 3 Habano W, Sugai T, Yoshida T, *et al.* Mitochondrial gene muta-

- tion, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instabilityJ. *Int J Cancer*, 1999, 83 (5) : 625 ~ 629.
- 4 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, *et al.* Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinomaJ. *Gastroenterology*, 2000, 118(5) : 835 ~ 841.
- 5 Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genomeJ. *Oncogene*, 1998, 17 (15) : 1 931 ~ 1 937.
- 6 Maximo V, Soares P, Seruca R, *et al.* Comments on: mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumors of Japanese patients, Tamura, *et al.* *Eur J Cancer* 1999, 35, 316 - 319 J. *Eur J Cancer*, 1999, 35(9) : 1 407 ~ 1 408.
- 7 Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, *et al.* Somatic mitochondrial mutation in gastric cancerJ. *Am J Pathol*, 1995, 147(4) : 1 105 ~ 1 111.
- 8 Richard SM, Bailliet G, Paez GL, *et al.* Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer J. *Cancer Res*, 2000, 60(15) : 4 231 ~ 4 237.
- 9 Horton TM, Petros JA, Heddi A, *et al.* Novel mitochondrial DNA deletion found in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996, 15(2) : 95 ~ 101.
- 10 Clayton DA, Vinograd J. Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cellsJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, 62(4) : 1 077 ~ 1 084.
- 11 Lu X, Walker T, MacManus JP, *et al.* Differentiation of HT-29 human colonic adenocarcinoma cells correlates with increased expression of mitochondrial RNA; effects of trehalose on cell growth and maturationJ. *Cancer Res*, 1992, 52(13) : 3 718 ~ 3 725.
- 12 Luciakova K, Kuzela S. Increased steady-state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondriaJ. *Eur J Biochem*, 1992, 205(3) : 1 187 ~ 1 193.
- 13 LaBiche RA, Demars M, Nicolson GL. Transcripts of the mitochondrial gene ND5 are overexpressed in highly metastatic murine large cell lymphoma cellsJ. *In Vivo*, 1992, 6(4) : 317 ~ 324.
- 14 Sharp MG, Adams SM, Walker RA, *et al.* Differential expression of the mitochondrial gene cytochrome oxidase in benign and malignant breast tissueJ. *J Pathol*, 1992, 168(2) : 163 ~ 168.
- 15 Heerdt BG, Halsey HK, Lipkin M, *et al.* Expression of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase in Human Colonic Cell Differentiation, Transformation, and Risk for Colonic Cancer J. *Cancer Res*, 1990, 50(5) : 1 596 ~ 1 600.
- 16 Boultonwood J, Fidler C, Mills KI, *et al.* Amplification of mitochondrial DNA in acute myeloid leukaemiaJ. *Br J Haematol*, 1996, 95(2) : 426 ~ 431.
- 17 Liang BC, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomasJ. *Cancer Lett*, 1996, 105 (2) : 167 ~ 173.
- 18 Heerdt BG, Chen J, Stewart LR, *et al.* Polymorphisms but lack of mutations or instability in the promoter region of the mitochondrial genome in human colonic tumorsJ. *Cancer Res*, 1994, 54 (14) : 3 912 ~ 3 915.
- 19 Yeh JJ, Lunetta KL, Van Orsouw NJ, *et al.* Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumoursJ. *Oncogene*, 2000, 19(16) : 2 060 ~ 2 066.
- 20 Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, *et al.* Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluidsJ. *Science*, 2000, 287(5460) : 2 017 ~ 2 019.
- 21 Shay JW, Baba T, Zhan QM, *et al.* HeLaTG cells have mitochondrial DNA inserted into the c-myc oncogeneJ. *Oncogene*, 1991, 6(10) : 1 869 ~ 1 874.
- 22 Kaniimura N, Ishii S, Ma LD, *et al.* Three separate mitochondrial DNA sequences are contiguous in human genome DNAJ. *J Mol Biol*, 1989, 210(4) : 703 ~ 707.
- 23 Cavalli LR, Varella-Garcia M, Liang BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNAJ. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(11) : 1 189 ~ 1 198.
- 24 Hayashi J, Takemitsu M, Nonaka I. Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cellsJ. *Somat Cell Mol Genet*, 1992, 18(2) : 123 ~ 129.
- 25 Ballinger SW, Boudier TG, Davis GS, *et al.* Mitochondrial genome damage associated with cigarette smokingJ. *Cancer Res*, 1996, 56(24) : 5 692 ~ 5 697.
- 26 Yakes FM, Houten BV. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stressJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2) : 514 ~ 519.
- 27 Beckman KB, Ames BN. Endogenous oxidative damage of mtDNAJ. *Mutat Res*, 1999, 424 (1 - 2) : 51 ~ 58.
- 28 Niranjana BG, Bhat NK, Avadhani NG. Preferential Attack of Mitochondrial DNA by Aflatoxin B₁ During HepatocarcinogenesisJ. *Science*, 1982, 215 : 73 ~ 75.
- 29 Penso J, Beitner R. Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cellJ. *Eur J Pharmacol*, 1998, 342(1) : 113 ~ 117.
- 30 Sweet S, Singh G. Accumulation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpointsJ. *Cancer Res*, 1995, 55(22) : 5 164 ~ 5 167.
- 31 Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stressJ. *IUBMB Life*, 1999, 48 : 41 ~ 47.