

[文章编号] 1000-1182(2010)03-0254-03

口腔鳞状细胞癌线粒体DNA高变区及高变区突变的功能意义

王耀钟 贾暮云 袁荣涛 韩国栋 卜令学

(青岛大学医学院附属医院 口腔颌面外科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的 检测口腔鳞状细胞癌线粒体DNA(mtDNA)复制控制区D环(D-loop)区的高变区(HVR)及高变区(HVR)的突变情况,并探讨其意义。方法 以癌旁组织和正常组织为对照,对7例口腔鳞状细胞癌组织样本的mtDNA D-loop HVR区及HVR区进行聚合酶链反应(PCR)扩增和测序分析。结果 在7例患者的癌组织、癌旁组织、正常组织样本中共发现82个(56种)核苷酸改变,其中51个(26种)为核苷酸多态性改变;3个肿瘤组织样本中共发现31个(30种)突变,其中21个位于HVR区及HVR区范围内;癌旁组织及正常组织未发现突变;口腔鳞状细胞癌的mtDNA D-loop HVR区及HVR区突变率为42.9%(3/7)。结论 mtDNA D-loop HVR区及HVR区的突变与口腔鳞状细胞癌的发生相关,为寻找新的肿瘤基因诊断和肿瘤遗传易感性的标志物提供了依据。

[关键词] 鳞状细胞癌; 线粒体DNA; 突变

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.03.007

The mutations of the D-loop hypervariable region and hypervariable region of mitochondrial DNA in oral squamous cell carcinoma WANG Yao-zhong, JIA Mu-yun, YUAN Rong-tao, HAN Guo-dong, BU Ling-xue. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the frequency of mitochondrial DNA(mtDNA) D-loop hypervariable region (HVR) and hypervariable region (HVR) mutations in oral squamous cell carcinoma(OSCC) and their correlation to provide the new targets for the prevention and treatment of OSCC. **Methods** The D-loop HVR and HVR regions of mtDNA in seven cases with OSCC tissues, matched with paracancerous tissues and normal mucosa tissues from the same case, were amplified by polymerase chain reaction(PCR), then were detected by direct sequencing to find the mutantsites after the comparison of all sequencing results with the mtDNA Cambridge sequence in the GenBank database. **Results** 82(56 species) nucleotide changes, with 51(26 species) nucleotide polymorphism, were found after the comparison of all sequencing results with the mtDNA Cambridge sequence in the GenBank database. 31(30 species) mutations, with 21 located within the HVR and HVR regions, were found in 3 tumor tissue samples, their paracancerous and normal mucosa tissue were found more polymorphic changes but no mutation. The mtDNA D-loop HVR and HVR regions mutation rate was 42.9%(3/7) in OSCC. **Conclusion** The mtDNA D-loop HVR and HVR regions were highly polymorphic and mutable regions in OSCC. It suggested that the D-loop HVR and HVR regions of mtDNA might play a significant role in the tumorigenesis of OSCC. It may become new targets for the gene therapy of OSCC by regulating the above indexes.

[Key words] squamous cell carcinoma; mitochondrial DNA; mutation

人类组织细胞线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是一环状、双链DNA,是人体细胞核之外的唯一遗传物质,可以编码自身的核糖体核糖核酸

(ribosomal ribonucleic acid, rRNA)、转运核糖核酸(transfer ribonucleic acid, tRNA)以及部分蛋白质,分为编码区和非编码的D环(D-loop)区。D-loop区是mtDNA分子复制和转录的调控中心,也是mtDNA和核基因组之间进行信息交换的枢纽。由于此区多态性发生率较高,又称高变区,通常分为高变区(hypervariable region, HVR)、高变区(hypervariable region, HVR)、高变区(hypervari-

[收稿日期] 2009-09-07; [修回日期] 2010-03-22

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金资助项目(08DZ2271100); 上海市重点学科建设基金资助项目(S30206-Kf13)

[作者简介] 王耀钟(1983—),男,山东人,硕士

[通讯作者] 贾暮云, Tel: 13589268356

able region , HVR) 及其周边区域。其中HVR 区位于57~372核苷酸之间, HVR 区位于438~576核苷酸之间。近年来, 已在肝癌^[1]、肺癌^[2]、乳腺癌^[3]、宫颈癌^[4]、膀胱癌^[5]等多种肿瘤中发现了mtDNA突变, 其中D-loop区是突变热点区域, 但不同类型的肿瘤所报道的突变率以及突变类型各不相同, 其在肿瘤发生、发展中的作用尚不清楚。本研究采用了聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物直接测序的方法, 对7例口腔鳞状细胞癌的癌组织、癌旁组织及正常组织mtDNA的D-loop HVR 区及HVR 区序列进行突变检测, 探讨mtDNA突变与口腔鳞状细胞癌的关系。

1 材料和方法

1.1 标本

选取2008年11月在青岛大学医学院附属医院口腔颌面外科手术的7例口腔鳞状细胞癌患者的癌组织、癌旁组织及正常组织。7例患者中男5例, 女2例; 年龄为54~71岁, 平均年龄67岁。其中牙龈癌2例, 舌癌3例, 口底癌1例, 腭癌1例。

病例纳入标准为: 1)术前未接受放、化疗及任何生物治疗; 2)癌旁组织位于肿瘤边缘外1.0 cm, 正常组织位于肿瘤边缘外2.0 cm, 经病理证实无癌变。排除标准为: 非原发于口腔的转移癌。

1.2 主要试剂

GENMED动物细胞/组织线粒体DNA萃取试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)、PCR TaqMix(广州东盛生物科技有限公司)。

1.3 mtDNA的制备

新鲜组织切取后立即置入液氮中保存, 实验时取出, 以无菌剪刀将组织剪碎后放入15 mL锥形离心管中, 按照GENMED动物细胞/组织线粒体DNA萃取试剂盒说明进行操作, 提取得到20 μ L(2 ng \cdot μ L⁻¹) mtDNA。

1.4 PCR扩增

mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区行PCR扩增, 引物由上海生工生物工程技术有限公司协助合成。上游引物序列为: 5'-CTATTAACCACT-CACGGGAGCTCTC-3', 下游引物序列为: 5'-ATC GTGGTGATTTAGAGGGTGAAC-3', 扩增产物为包括D-loop HVR 区及HVR 区455 bp在内的724 bp片段。PCR扩增反应总体积50 μ L, 其中DNA模板1 μ L(2 ng), 上、下游引物各2 μ L(10 μ mol \cdot L⁻¹), 2 \times PCR TaqMix 25 μ L, 加ddH₂O至50 μ L, 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min; 62 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min; 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。取5 μ L PCR产物行1.5%琼脂

糖凝胶电泳, 确定产物成功扩增。

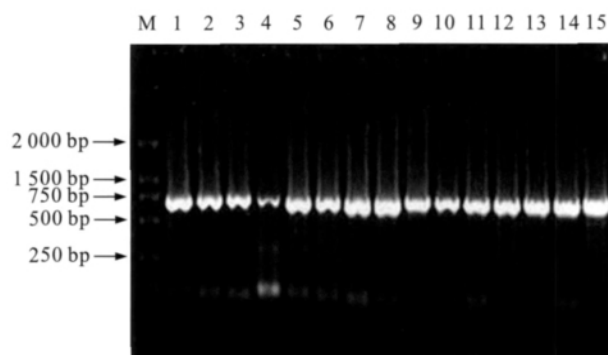
1.5 测序分析

在完成产物的纯化及测序后, 将肿瘤组mtDNA D-loop区序列与癌旁组及正常组对比, 并且与GenBank提供的线粒体DNA Cambridge序列比较, 若肿瘤组和癌旁组中mtDNA D-loop区的核苷酸顺序相同, 但与正常组不同, 认为这种改变为癌组织和癌旁组织均发生突变。当癌旁组与正常组一致, 而肿瘤组与癌旁组和正常组不一致时, 认为癌组织发生突变。若肿瘤组与癌旁组和正常组mtDNA D-loop区的核苷酸均一致, 但与mtDNA Cambridge序列不同, 则为多态性改变。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

7例癌组织、癌旁组织和正常组织mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区PCR扩增产物均存在724 bp大小的清晰目的片段条带(图1)。



M: Marker; 1~15: 样本编号。

图1 口腔鳞状细胞癌组织mtDNA PCR扩增产物的电泳结果

Fig 1 The results of the electrophoretic assay of mtDNA PCR product

2.2 PCR扩增产物直接测序结果

测序结果显示峰图清楚, 目标区段可读率为100%, 未见杂峰(图2)。

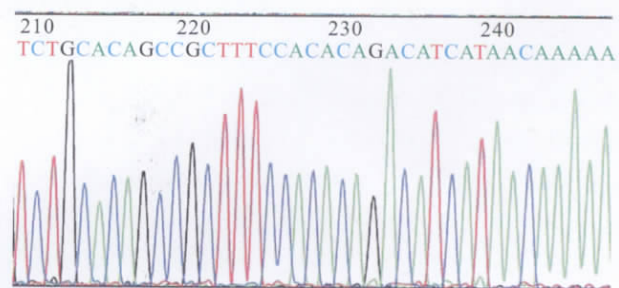


图2 mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区测序图

Fig 2 Sequence chart of mtDNA D-loop HVR and HVR regions

2.3 测序结果的分析

所有测序结果与GenBank数据库mtDNA Cambridge序列对比后共发现82个(56种)核苷酸改变,

其中51个(26种)为核苷酸多态性改变;3个肿瘤组织样本中共发现31个(30种)突变,其中21个位于HVR 区及HVR 区范围内;邻近正常组织较多多态性变化,未检出突变;癌旁组织及正常组织未发现突变;口腔鳞状细胞癌mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区突变率为42.9%(3/7)。

3 讨论

人类mtDNA的遗传信息显示,在仅仅16 569 bp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-loop区外,在相邻的基因之间极少有非编码碱基,因此常把D-loop区第16 024至576核苷酸之间的1 122 bp片段称为控制区,它负责整个mtDNA分子复制和转录的调控^[6]。mtDNA分子游离于线粒体基质中,缺乏组蛋白保护,其损伤修复系统也不完善。与核DNA相比,它更易受各种致癌物质的攻击。而D-loop区是突变的热点区域,且发生于D-loop区的突变情况严重得多,将引起整个线粒体功能的紊乱^[7]。D-loop区突变高的原因可能与其结构特点有关:1)D-loop区是mtDNA与线粒体内膜相接触的位点,更容易受到脂酶过氧化物的损伤;2)mtDNA复制时,D-loop区形成三链结构,易受到损伤。从突变性质看,D-loop区频繁的A-C、C-T替换可能影响整个线粒体基因组的复制与转录,如发生在D-loop区调控元件上的突变,通过与核基因的突变相互作用等途径影响肿瘤的发生和发展^[8]。

本研究检测了7例口腔鳞癌组织、癌旁组织及正常组织mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区的突变,共发现82个(56种)核苷酸改变,其中51个(26种)为多态性改变,可见此区是一高度多态性区域,这种高度多态性反映了mtDNA的高度突变性。3例癌组织共发现31个(30种)突变,包括点突变、插入突变和缺失突变,癌旁组织及正常组织未发现突变,突变率为42.9%,提示了mtDNA D-loop HVR 区及HVR 区的变异可能与口腔鳞癌发生的易感性有关,其确切相关性还需大样本的验证。多态性和突变性可能导致该区域的高度不稳定性,而D-loop区的不稳定性则可能影响编码区的稳定,进而导致编码区的突变。有报道认为D-loop区的突变与某些编码区突变相关,从而改变蛋白质合成以影响线粒体的功能,进而使细胞能量供应发生障碍,产生大量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),高水平的ROS不仅参与细胞凋亡,同时可以促进核DNA的突变和细胞分裂,从而使肿瘤细胞获得选择性增长优势而引发肿瘤的发生^[9-10]。

肿瘤的发生是个多因素、多步骤的过程,是由

多种癌基因的突变及抑癌基因失活的综合作用而引起的。线粒体被认为是细胞凋亡的中心,其变化可能会影响到细胞的生长模式,即影响细胞的坏死、凋亡或无限增殖,mtDNA突变在肿瘤发生中具有重要的生物学意义。有关mtDNA突变在头颈部肿瘤发生发展中地位和作用的研究,显示D-loop区是人类线粒体基因组中变异最大的部分,也是突变最常发生的部位。Sanchez-Céspedes等^[11]发现41%的头颈鳞状细胞癌在D-loop区有突变。Ha等^[12]发现其突变率随不典型增生的分级逐渐增高。轻度、中度、重度不典型增生和原位癌组的线粒体突变率分别为单纯增生组的1.8、2、3.6、5.7倍,并认为这一改变在头颈肿瘤的发生中是一个早期事件。Lièvre等^[13]发现在下咽癌中D310的突变更加频繁。Prior等^[14]发现了3个突变热点,即nt146、152、186,特别是nt186可能用于诊断口腔鳞状细胞癌的生物标记。D-loop区突变可能成为检测头颈鳞癌发生风险的有效独立手段。因此,深入研究肿瘤细胞mtDNA的结构及表达调控变化,探讨细胞癌变与mtDNA D-loop区突变之间的关系,对阐明细胞的癌变机制具有重要的意义。如果mtDNA与肿瘤发生及生物学特性的关系能得到证实,mtDNA将有望成为肿瘤基因诊断和肿瘤遗传易感性的标志物,为肿瘤病因学研究开拓一个新的领域。

[参考文献]

- [1] Hung WY, Lin JC, Lee LM, et al. Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region[J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(2): 137-142.
- [2] Onishi M, Saito M, Sokuza Y, et al. Numerical changes in the mitochondrial DNA displacement loop in lung lesions induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine in rats[J]. *Mutat Res*, 2008, 638(1/2): 133-138.
- [3] Gochhait S, Bhatt A, Sharma S, et al. Concomitant presence of mutations in mitochondrial genome and p53 in cancer development—a study in north Indian sporadic breast and esophageal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(11): 2580-2586.
- [4] Chen D, Zhan H. Study on the mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA in cervical carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(2): 291-295.
- [5] Wada T, Tanji N, Ozawa A, et al. Mitochondrial DNA mutations and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine content in Japanese patients with urinary bladder and renal cancers[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5A): 3403-3408.
- [6] Penta JS, Johnson FM, Wachsmann JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. *Mutat Res*, 2001, 488(2): 119-133.
- [7] 詹宏杰. 肿瘤热疗的研究[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2005, 32

中, PYM和PYM-CH-NP对Tca8113和BcaCD885均有强的杀伤作用, 其抑癌作用随着药物浓度的增加和作用时间延长呈递增性, 提示活性炭纳米微粒吸附抗癌药物形成的新剂型并不影响携带药物的药理学作用。低药物浓度下, PYM-CH-NP的抑癌率明显低于PYM, 而高药物浓度下, 两者相近, 提示CH-NP吸附等量PYM后, 外周游离药物量低于PYM组, 该剂型减小了药物的毒性, 临床应用中有望提高用药的剂量而不致有过大的毒副作用。PYM-CH-NP是一种功能性缓释性, 也就是说, 本制剂中被纳米活性炭吸附的抗癌药物与纳米活性炭周围游离的药物之间始终保持一种动态平衡, 当游离的药物发挥作用被消耗后, 可根据吸附等温曲线的平衡关系, 等量的吸附药物便被释放到外周以补足被消耗的药物的量, 从而使纳米活性炭周围游离的抗癌药物始终保持一定的浓度。这种功能性缓释特性是以往的缓释制剂所没有的, 因此作用于肿瘤细胞时有望维持周围有效的浓度和作用时间, 发挥更好的抗癌活性^[8]。

[参考文献]

- [1] 周芸, 王津津, 陈靖, 等. 新型平阳霉素杀伤喉癌细胞系Hep-2细胞的体外实验研究[J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 2000, 7(4): 226-228.
ZHOU Yun, WANG Jin-jin, CHEN Jing, et al. Cytotoxic effect

of Pingyangmycin(Bleomycin-A5) on Hep-2 cell line of laryngeal carcinoma *in vitro*[J]. Chin Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 7(4): 226-228.

- [2] 孙明磊, 温玉明, 王昌美, 等. 淋巴靶向平阳霉素-活性炭纳米微粒的研制[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(3): 183-185.
SUN Ming-lei, WEN Yu-ming, WANG Chang-mei, et al. Preparation of lymphatic targeting dosage form: Pingyangmycin absorbed on activated carbon nanoparticles[J]. West China J Stomatology, 2004, 22(3): 183-185.
- [3] 于翠珍, 李双标, 李胜水, 等. 卵巢癌细胞MTT法对化疗药物敏感性的研究[J]. 中国医药导报, 2009, 6(2): 11-12.
YU Cui-zhen, LI Shuang-biao, LI Sheng-shui, et al. Research of chemotherapy drug susceptibility to ovary tumor cells by MTT method[J]. Chin Medical Herald, 2009, 6(2): 11-12.
- [4] Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(15): 1615-1626.
- [5] Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery[J]. Dis Mon, 2005, 51(6): 342-361.
- [6] Ademuyiwa FO, Miller KD. Incorporation of antiangiogenic therapies in the treatment of metastatic breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2008, 8(Suppl 4): S151-S156.
- [7] Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(8): 1127-1141.
- [8] Ito T, Hagiwara A, Takagi T, et al. Local administration of methotrexate bound to activated carbon particles(MTX-CH) for treating cancers in mice[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1401-1404.

(本文编辑 王晴)

(上接第256页)

(1) 35-37.

ZHAN Hong-jie. The research of tumor hyperthermia[J]. Foreign Medical Sciences Oncology Section, 2005, 32(1): 35-37.

- [8] Stoneking M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots[J]. Am J Hum Genet, 2000, 67(4): 1029-1032.
- [9] Sun W, Zhou S, Chang SS, et al. Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(2): 476-484.
- [10] Zhou S, Kachhap S, Sun W, et al. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(18): 7540-7545.

- [11] Sanchez-Céspedes M, Parrella P, Nomoto S, et al. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7015-7019.
- [12] Ha PK, Tong BC, Westra WH, et al. Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck: A marker for progression and clonal proliferation[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2260-2265.
- [13] Lièvre A, Blons H, Houllier AM, et al. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma[J]. Br J Cancer, 2006, 94(5): 692-697.
- [14] Prior SL, Griffiths AP, Baxter JM, et al. Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(5): 945-950.

(本文编辑 王晴)