

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.005

肾癌患者线粒体基因组 D 环区基因突变的研究

潘兴丽 关 晶

(济宁医学院生物科学系, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 通过检测肾癌基因组 D 环区体细胞突变及种系性变异情况, 探讨其与肾癌发生的关系。**方法** 选取肾癌患者 20 例, 对其癌组织、癌旁组织及外周血细胞总 DNA 进行 PCR 扩增并测序, 相关结果与线粒体文库中剑桥序列进行比对, 综合分析基因突变类型。**结果** 在 20 例肾癌患者各组织中, 共有 7 例检出线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的 D-环区 (displacement loop, D-Loop) 存在突变, 突变发生率为 35%, 涉及突变位点 17 个, 其中 4 个属微卫星不稳定序列; 20 例患者中共发现 9 个基因库未记载的新的多态性变化。**结论** 肾癌患者 mtDNA 的 D 环区具有高度多态性和高度突变率, 该区的基因突变在肾癌的形成中可能发挥重要作用。

关键词 肾癌; 线粒体 DNA; 突变; 多态性

中图分类号: R737.11 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)02-017-04

Study on the relation between mutations in D-loop region of mitochondrial DNA and tumorigenesis of renal cell carcinoma

PAN Xing-li, GUAN Jing

(College of Life Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To investigate the potential role of mitochondrial DNA mutations in tumorigenesis of renal cell carcinoma and analyze somatic mutations and polymorphisms of mitochondrial D-loop region in renal cell carcinoma. **Methods** The D-loop of mitochondrial DNA in tumor samples, paired normal tissues and peripheral blood samples were amplified by PCR and sequencing. The sequences were compared with the Cambridge sequence reported in Mitomap to analyze the mutation types. **Results** Seven variations were found in total 20 tumors. Mutation rate was 35%, 17 point mutations, of which 4 are microsatellite instability. Nine of the new gene pool was not recorded in the polymorphism changes in total 20 tumors. **Conclusion** Mitochondrial DNA D-loop has high polymorphisms and high somatic mutations. The variants of the region might play an important role in tumorigenesis of renal cell carcinoma.

Key words: Renal cell carcinoma; Mitochondrial DNA; Mutation; Polymorphism

国内外大量报道显示^[1]: 肾癌的发病率占有所有恶性肿瘤的 2%~3%, 其致死率已经上升到所有致死性肿瘤的第 7 位, 且发病率在世界范围内仍呈逐年上升趋势。早在 20 世纪 70 年代, 人类就开始了线粒体基因突变与肿瘤发生关系的研究。自 Polyak K^[2]于 1998 年首先发现结直肠癌中线粒体 DNA (mitochondrial, mtDNA) 基因型存在突变以来, 肿瘤的发生与 mtDNA 突变间的关系逐渐成为近年医学研究的热点, 到目前为止, 在多种肿瘤组织中均发现了不同的 mtDNA 突变位点^[3-5]。线粒体 D-loop 区又称控制区 (control region, CR) 或非

编码区 (non-coding region, NC)。D-loop 区基因突变将直接导致线粒体功能紊乱, 进一步影响线粒体编码区的功能^[6]。本文通过对肾癌患者癌组织 mtDNA 的 D-loop 区基因突变进行检测和对照分析, 可为肾癌发生的病因学研究提供相关实验依据, 并为肾癌的临床诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取经病理证实为肾癌患者 20 例, 其中男性 15 例, 女性 5 例, 年龄 28~78 岁, 平均年龄 (52.21

±19.87)岁。在签订知情同意后,选取肾癌患者手术中切下的肿瘤组织及少量距肿瘤组织边缘 5 cm 以外的正常组织作为研究材料,所有组织取下后即刻置入-80℃保存。

1.2 DNA 抽提

DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司),提取肾癌组织及相应外周正常组织的细胞总 DNA。

1.3 PCR 扩增及序列测定

D-loop 区的 PCR 扩增引物采用 primer 5.0 软件进行设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物(nt15791-15810)为:5'-AT-CATTGGACAAGTAG-CATC-3',下游引物(nt725-706)为:5'-GGTGAACCT-CACTG-GAACGGG-3'。PCR 的反应体积为 50μl,包括 2 种引物(20 pmol/μl)各 1μl;10×PCR 缓冲液 5μl;dNTPs(2.5 mmol/L)4μl;Mg²⁺(25 mmol/L)3μl;ExTaq DNA 聚合酶(5 U/μl)0.5μl 及细胞 DNA100 ng。PCR 扩增:变性(94℃,45 s)、复性(56℃,45s)、延伸(72℃,90s)、结束延伸(72℃,7min),重复 35 个循环。取 2μl 反应产物,在 1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳。对于扩增效果好且足量的样品,进一步进行纯化和测序(委托上海生工生物工程技术有限公司进行),测序反应所用引物与 PCR 反应引物相同,所有样品均进行双向测序。

1.4 序列分析

扩增后的测序结果采用 DNASTar 软件的 Megalign5.00 程序进行分析,序列变化与标准剑桥 mtDNA 序列进行比对^[7]。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

用 nt15791-15810/nt725-706 引物扩增各标本 mtDNA,所有样品均扩增出 1450bp 片段,扩增片段大小与预期相一致,见图 1。

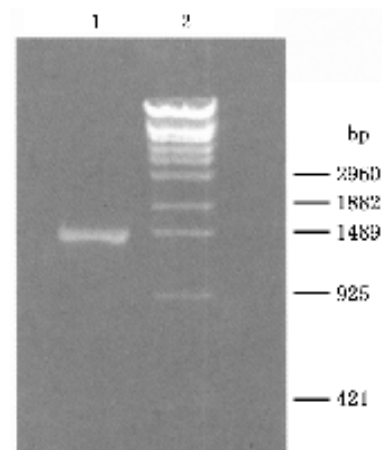
2.2 肾癌患者 mtDNA D-loop 区突变情况

在所有的 20 例肾癌患者中,有 7 位患者的肿瘤组织中发现了 17 个不同的突变,因此初步推断肾癌细胞 mtDNA D-loop 区的突变率约为 35%;17 个突变中 4 个属微卫星不稳定序列(表 1)。

2.3 肾癌患者 mtDNA D-loop 区多态性变化情况

通过将肾癌患者 mtDNA D-loop 区所测位点与基因库数据进行对照,发现 206 个核苷酸变化,其中 197 个多态性位点改变已有文献报道,但在 6

位患者中发现的 9 个多态性位点未见报道(表 2)。



注:1. 肾癌组织 DNA 扩增结果;2. Marker

图 1 线粒体 DNA D-环区的 PCR 扩增

表 1 肾癌细胞 mtDNA D-loop 区突变情况

位点	Genebank	肾癌细胞核苷酸	正常肾组织核苷酸
16165	C,T	T	C
16223	T,C	C	T
16235	C	缺失	C
16366	T	C	T
16411	C	A	C
16438	G	A	G
16465	A	T	A
16476	A,G	缺失	G
16492	C	T	C
46	C	T	C
69	C,T	T	C
164	C	A	C
234	G	A	G
303	(C) ₅	(C) ₆	(C) ₅
372	T	C	T
393	(C) ₇	(C) ₉	(C) ₈
502	(CA) ₇	(CA) ₈	(CA) ₇
564	(C) ₆	(C) ₇	(C) ₆

表 2 肾癌患者 mtDNA D-loop 区多态性变化

位点	Genebank	肾癌细胞核苷酸	正常肾组织核苷酸
16184	A	G	G
16195	C	T	T
16358	T	C	C
16527	C	T	T
16556	G	A	A
64	C	T	T
277	T	C	C
489	C	T	T
516	C	T	T

3 讨论

目前已证实在多种肿瘤细胞中都存在 mtDNA 的突变,其原因主要涉及 2 个发病相关机制:mtDNA 突变后导致的非随机分离和(或)mtDNA 突变引起的凋亡过程改变。当正常细胞内出现 mtDNA 突变时,该细胞正常能量代谢受到影响,细胞为维持代谢平衡,经多次分裂,采用非随机分离的方式,将突变的 mtDNA 分子集中到某一子细胞中,这一子细胞由于含有大量的突变 mtDNA,其呼吸作用受到抑制,最终导致死亡,其余不含突变 mtDNA 的细胞,则明显获得选择性生长优势,细胞快速生长,组件失去控制,从而发生癌变;凋亡机制则强调 mtDNA 的突变导致线粒体内各种蛋白合成、分布及转运发生异常,线粒体内膜的膜电位及通透性也受到影响,原本结合在线粒体内膜上细胞色素 C(cytochrome C)也向线粒体外侧转移,进而激活内源性凋亡途径^[8]。

由于外界环境和自身遗传机制的共同作用,mtDNA 的高突变率主要发生在 D-loop 区,目前实验证实:在正常人群中,非相关个体间的 mtDNA 中会有约 0.3%(50 个)的核苷酸序列互不相同,且绝大部分分布在 D-loop 区及非编码区(Non-Coding region,NC)^[9]。本文结果显示在 20 例肾癌患者细胞的 mtDNA 的 D-loop 区中共发现了 206 个多态性变化,与基因库记载相比对,亦有 9 个新的多态性位点,可见 mtDNA 的 D-loop 区是一个具有高度多态性及高度突变性的片段。Fliss 等^[10]报道 D-loop 区突变率在头颈部肿瘤、肺癌和膀胱癌中的比例分别为 3/13、5/13 和 4/14;Habano 等^[11]在对 45 对结肠癌患者癌细胞和正常组织 mtDNA 突变进行检测时发现,44%(20/45)D-loop 区存在 CA 不稳定和多聚 C(PolyC)不稳定;Burgart 等^[12]通过对 32 例胃腺瘤患者癌细胞 mtDNA 也进行了突变检测,发现 12.5%(4/32)D-loop 区突变的原因是由于 50bp 缺失造成的,这说明 D-loop 区的改变在不同的肿瘤中是存在差异的。

核基因组和线粒体基因组信息交换的枢纽是 D-loop 区,其在 mtDNA 的复制和转录控制中也起着重要作用。虽然目前不能完全确定 D-loop 区的变异与肿瘤的发生直接相关,但可以证实 mtDNA 的 D-loop 区具有高度的多态性及突变性。由于剑桥 mtDNA 序列数据库中的序列信息来源于西方人群,因此不排除 mtDNA 的 D-loop 区多态性及突

变性有地域、国家和人种间的差异。目前有研究认为:核微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)可能会导致编码区发生突变,所以 mtDNA 的突变是通过某些核基因的改变而发挥作用的,也有可能是两者协同作用共同参与肿瘤的发生发展。因此,肿瘤细胞中 mtDNA 的复制和转录水平的变化可能与 mtDNA 的 NC 区的突变有关。探明 mtDNA 不同位点突变所导致的相应生物功能上的改变,这将为肿瘤的早期诊断及药物治疗提供新的依据,具有重要的理论与临床意义。

综上所述,肾癌组织线粒体 DNA D-环区具有高度多态性和高突变率,该区的基因突变可能与肾癌的发生具有相关性。线粒体功能紊乱是肿瘤发生的表现之一,可能成为肿瘤诊断和治疗的新方法,但要应用于临床,仍有一些问题有待解决。

参考文献:

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1):10-30.
- [2] Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors[J]. Nat Genet, 1998, 20(3):291-293.
- [3] Zhu W, Qin W, Sauter E R. Large-scale mitochondrial DNA deletion mutations and nuclear genome instability in human breast cancer[J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(2):119-126.
- [4] Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 287(5460):2017-2019.
- [5] Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, et al. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9):2875-2878.
- [6] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. Gene, 1997, 205(1/2):125-140.
- [7] MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA. <http://www.mitomap.org>, 2001.
- [8] Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, et al. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(7):4038-4043.
- [9] Guo XG, Guo QN. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in human osteosarcoma[J]. Cancer Lett, 2006, 239(1):151-155.
- [10] Fliss MS, Usadel H, Otavia L, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumor and body fluids[J]. Science, 2000, 287(5460):2017-2019.

(下转第 26 页)

表2 脂联素的表达与甲状腺乳头状癌的临床病理联系(n,%)

	脂联素的表达		t/ χ^2	P
	阳性(+) (n=72)	阴性(-) (n=6)		
浸润侵袭				
是	23(31.9)	5(83.3)	6.356	0.12
否	49(68.1)	1(16.7)		
淋巴结转移				
转移	17(23.6)	3(50)	2.023	0.155
未转移	55(76.4)	3(50)		
年龄(岁)	44.58±12.58	43.50±16.91	0.198	0.844
术前体重(kg)	63.44±10.35	52.83±11.02	2.4	0.019*
绝经情况				
绝经	21(29.2)	3(50)	0.441	0.664
未绝经	37(70.8)	3(50)		
肿块大小(cm)	9.12±29.17	6.12±4.89	0.25	0.803
多发性				
单发	24(82.8)	5(17.2)	5.928	0.025*
多发	48(98.0%)	1(2.0%)		

3 讨论

脂联素为脂肪细胞分泌的一种细胞因子。Kitahara CM 等研究发现肥胖与甲状腺癌的发病风险有关^[5]。本文结果显示,脂联素在甲状腺乳头状癌中的表达与术前体重有关,本结果与 Kitahara CM 等研究结果一致。

Mitsiades N 等^[6]发现,循环脂联素与甲状腺癌的发生成负相关,其水平高患甲状腺癌的风险降低,被认为是一种保护因子。本实验采用免疫组化法测定脂联素在甲状腺乳头状癌的表达,结果显示甲状腺乳头状癌脂联素高表达,在甲状腺乳头状癌的发生发展中起一定作用。

Cheng 等^[3]发现脂联素受体 1 和脂联素受体 2 在甲状腺乳头状癌组织表达比癌旁组织高,脂联素受体表达与癌组织的侵袭、多中心性和肿瘤的分级有关,脂联素受体在甲状腺乳头状癌组织中的过度表达被认为与癌症好的预后有关。本实验采用免疫组化的方法检测 78 例甲状腺乳头状癌和 12 例甲状腺腺瘤组织标本,脂联素在甲状腺乳头

状癌中的阳性表达率 94.4%,在甲状腺腺瘤中的阳性表达率 66.74%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。对 78 例甲状腺乳头状癌患者的临床病理特征分析发现脂联素在癌组织中高表达,并且与患者的肿瘤多发性有关,与 Cheng 等的研究结果一致。

综上所述,甲状腺乳头状癌中脂联素表达与甲状腺乳头状癌有关,术前体重的增加可能是甲状腺乳头状癌发生发展的一个重要因素,肿瘤组织脂联素高表达可能与肿瘤多发性有关。甲状腺乳头状癌组织中脂联素分泌增多,降低甲状腺肿瘤组织中脂联素的表达,增加循环血液中脂联素水平可能降低组织恶变改善预后,为甲状腺乳头状癌的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] 侯森,崔文.瘦素脂联素及其受体与甲状腺癌关系的研究进展[J]. 济宁医学院学报,2013,36(3):221-224.
- [2] 仲秀秀,张国安,崔文.脂联素及其受体与恶性肿瘤相关性研究进展[J]. 济宁医学院学报,2013,36(5):336-338.
- [3] Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence[J]. Endocr Rev, 2012, 33(4): 547-594.
- [4] Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, et al. Expression and biologic significance of adiponectin receptors in papillary thyroid carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 65(2): 203-210.
- [5] Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U. S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(3): 464-472.
- [6] Mitsiades N, Pazaitou-Panayiotou K, Aronis KN, et al. Circulating adiponectin is inversely associated with risk of thyroid cancer: in vivo and in vitro studies[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12): E2023-E2028.

(收稿日期 2013-12-15)

(上接第 19 页)

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

(上接第 23 页)

- [5] Baker OJ, Schulz DJ, Camden JM, et al. Rat parotid gland cell differentiation in three-dimensional culture[J]. Tissue Engineering Part C: Methods, 2010, 16(5): 1135-1144.
- [6] Jean-Gilles R, Soscia D, Sequeira S, et al. Novel modeling approach to generate a polymeric nanofiber scaffold for salivary

- [12] Burgart LJ, Zheng J, Shu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors[J]. Am J Pathol, 1995, 147(4): 1105-1111.

(收稿日期 2013-09-28)

gland cells[J]. Journal of nanotechnology in engineering and medicine, 2010, 1(3): 031008.

- [7] Kato N, Higuchi J, Ogata S, et al. Spherule-like acellular stroma in clear cell carcinoma of the ovary: its utility in frozen section diagnosis[J]. Histopathology, 2011, 59(4): 790-794.

(收稿日期 2013-12-31)