

文章编号:1673-3770(2008)04-0304-03

喉鳞状细胞癌组织线粒体基因 D-310 区碱基的多态性

韩月臣,樊兆民,徐伟,李建峰,吕正华,王海波

(山东大学附属省立医院耳鼻咽喉-头颈外科,济南 250021)

摘要:目的 探讨喉鳞状细胞癌组织中线粒体基因 D310 区碱基序列多态性及其临床意义。方法 提取 11 例喉鳞状细胞癌组织总 DNA,利用聚合酶链反应(PCR)对线粒体基因包含 D310 区的 D-LOOP 区部分序列进行扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳并直接测序,观察该区碱基序列的改变。结果 D310 区多态性表现为多聚 C 保守片段胞嘧啶碱基数量的改变,发生率为 8/11(72.73%)。5/8(62.50%)的标本突变是同质性的,3/8(37.50%)标本为异质性突变。共检测到 6 种不同的序列改变,以单个胞嘧啶的插入最常见,约占全部序列改变的 50%。结论 在喉鳞状细胞癌组织,D310 区具有明显多态性,是突变的多发区域之一。

关键词:DNA,线粒体;基因,多态性;癌,鳞状细胞性;寡核苷酸序列分析

中图分类号:R739.65 文献标志码:A

Polymorphism of mitochondrial DNA at the D-310 region in laryngeal squamous cancer cells

HAN Yue-chen, FAN Zhao-min, XU Wei, LI Jian-feng, LÜ Zheng-hua, WANG Hai-bo

(Department of Otolaryngology & Head and Neck Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University,
Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To investigate the polymorphism of the D310 region of somatic mitochondrial DNA (mtDNA) in the human primary laryngeal squamous cell cancer. **Methods** Eleven cases of laryngeal squamous cell cancer were collected from in-patients who were confirmed by pathologic studies. The total DNA was amplified to identify the polymorphism of the D-310 region by the PCR technique, polyacrylamide gel electrophoresis and sequencing. **Results** Changes in length of short C base-repetitive sequencing were found in the conserved D310 region in 8 cases (72.73%). Most of the mutations (8/11) were homoplasmic mutations, and the others (3/11) were heteroplasmic mutations. Of the 6 kinds of mutation changes, insertion of one cytosine at the D-310 region was the most common, ranked about 50%. **Conclusions** The D310 region located in the D-Loop region could be a mutational hotspot in laryngeal squamous cell cancer.

Key words: Mitochondrial DNA; Mutation; Laryngeal squamous cell cancer; D-310 Region

线粒体 DNA 是存在于细胞核外的一种环状 DNA,通过细胞质遗传,与核 DNA 相比线粒体 DNA 对外界损伤因素更敏感而易于发生突变。Sanchez-Cespedes 等^[1]报道,在肿瘤中线粒体 DNA 突变散在分布在编码区和非编码区,其中位于 D-Loop 区的特

异的、高度多态性的多聚 C 区(D310 区)在原发性肿瘤是一个突变热点。我们通过对人喉鳞状细胞癌标本的线粒体基因组(包含 D310 区的部分 D-Loop 区碱基)序列的检测,探讨该肿瘤组织中线粒体 DNA D310 区碱基多态性的发生率及其临床意义。

收稿日期:2008-05-12;修回日期:2008-07-22

作者简介:韩月臣(1972-),男,博士,主治医师,主要从事耳鼻咽喉科的临床与基础研究。

通讯作者:王海波(1962-),男,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事耳科、耳神经及侧颅底外科的临床与研究工作。

Email:whbotologic797@163.com

1 资料与方法

1.1 临床资料 11 例喉鳞状细胞癌组织及癌旁正常组织标本,收集自我院 2005 ~ 2006 年住院患者,其中男 9 例,女 2 例,25 ~ 75 岁,平均 56 岁。均经病理确诊。

1.2 肿瘤及癌旁正常组织全基因组 DNA 提取 采用改进的酚、氯仿、异戊醇抽提法^[2],提取全基因组 DNA。基本步骤如下:①大约 50 mg 肿瘤组织剪碎,悬浮于细胞裂解液,37 °C 保温 1 h,间歇振荡;②加入蛋白酶 K,终浓度 10 mg/mL,55 °C 水浴 3 h,间歇振荡;③加入等体积 Tris 饱和酚,温和振荡 10 min,5000 g 常温离心 15 min;④留取水相,加入等体积酚、氯仿、异戊醇(25:24:1),抽提 1 ~ 2 次;⑤留取水相,加入等体积 Tris 饱和酚,抽提 1 次;⑥留取水相,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇和 1/10 体积 3M 醋酸钠,-20 °C 保存 1 h;⑦离心 12000 g,4 °C,10 min;⑧加入 75% 乙醇 1 ml 洗涤 1 次。12000 g 离心 5 min,弃上清,空气干燥;⑨所得 DNA 溶于 50 μL TE 溶液,-20 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增 扩增野生型线粒体 DNA 保守片段,所用引物序列如下:WS1 sense 5-AGG CGC TAT CAC CAC TCT GTT CG-3 (12600-12622);WA1 anti-sense 5-AAT AGG CTT CCG GCT GCC AG-3-3(13128-13148)。PCR 反应体系为 20 μL,终浓度为:Taq 酶 0.5 u,MgCl₂ 2.5 mM/L,dNTP 各 250 μmol/L,引物各 0.5 μmol/L,模板 DNA 100 ~ 300 ng。反应条件:首次变性 95 °C 2 min,然后 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 45 s,共 40 个循环,末次延伸 72 °C 7 min。

扩增线粒体 DNA D-Loop 区部分序列,所用引物为使用软件 Primer primere 5.0 设计,引物序列如下:T1S sense 5-CAG TCA AAT CCC TTC TCG TC-3 (15768 - 15787);T1A antisense 5-TCT GGT TAG GCT GGT GTT AG-3 (16365-16384)。反应体系、反应条件同前。

PCR 产物于加有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 1 × TAE,电压 10 V/cm。凝胶成像分析系统照相(英国 UVP 公司,GMS8000)。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 各标本 PCR 产物 5 μL,1 μL 6 × 上样缓冲液,30% 聚丙烯酰胺凝胶,1 × TBE,电压 200 V,电泳时间 5 ~ 6 h。凝胶置入含 0.5 mg/mL 溴化乙锭的 1 × TBE 溶液中染色 15 min,凝胶成像分析系统照相、分析(英国 UVP 公司,GMS8000)。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶回收 DNA 片段 标本 T₁、T₂、T₃ 的 PCR 产物各 90 μL,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,在紫外光下将相应 DNA 条带切取,应用碾碎浸泡法纯化回

收。回收后再次 PCR 扩增,反应体系及条件同前。

1.6 测序 所有 PCR 产物使用 ABI100 全自动测序仪测序(参考线粒体 DNA 序列 Genbank X93334)。

2 结果

对所有标本进行 PCR 扩增,使用引物对 WS1、WA1 可扩增出线粒体 DNA 的保守片段,产物长度为 549 bp;使用引物对 T1S、T1A,均可扩增出预期为 617 bp 大小的目的条带(图 1)。30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,11 例标本中有 8 例肿瘤组织 PCR 目的片段长度与正常组织对照比较存在差异。标本 T₁、T₂、T₃ (3/8,37.50%) 可见相差约数个碱基的 2 条 DNA 条带,说明肿瘤细胞中存在两种不同的线粒体 DNA,为异质性突变(图 2),经扫描光密度分析,3 例标本中突变与正常线粒体 DNA 的含量比值分别为:T₁ - 60.62%;T₂ - 26.37%;T₃ - 20.80%,其余 5 例为同质性突变(5/8,62.50%)。所有测序结果与 Genbank 报道的人正常线粒体基因(Genbank X93334)D-310 区的碱基序列相比较,共发现 6 种不同碱基序列改变(图 3),具体碱基序列改变见表 1。

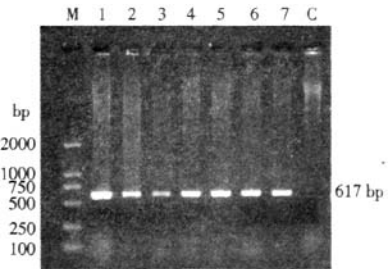


图 1 喉鳞状细胞癌线粒体 DNA D-LOOP 区部分片段扩增产物,长度 617 bp(1% 琼脂糖凝胶,1 × TAE)。M:Marker; C:阴性对照。

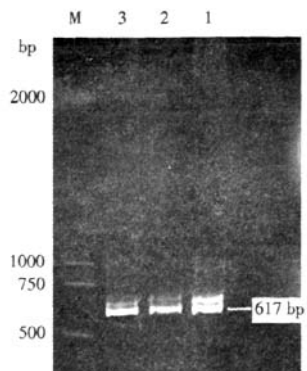


图 2 喉鳞状细胞癌 PCR 产物 30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图,3 个肿瘤标本 PCR 产物可见相差约数个碱基的 2 条 DNA 条带。M:Marker(1 × TBE,电压 200 V)

表1 D310区碱基改变

D310多聚C区碱基序列	16296 C C C C C C C T C C C C C C C 16309			
	突变(16296-16302)	发生率(%)	突变(16302-16309)	发生率(%)
突变序列(8/11)	C 7 - C 6	1/11(9.1)	C 6 - C 5	1/11(9.1)
	C 7 - C 8	5/11(45.5)	C 6 - C 7	1/11(9.1)
	C 7 - C 9	2/11(18.2)	16304C-T	2/11(18.2)
正常序列(3/11)	C 7(16296-16302)		C 6(16304-16309)	

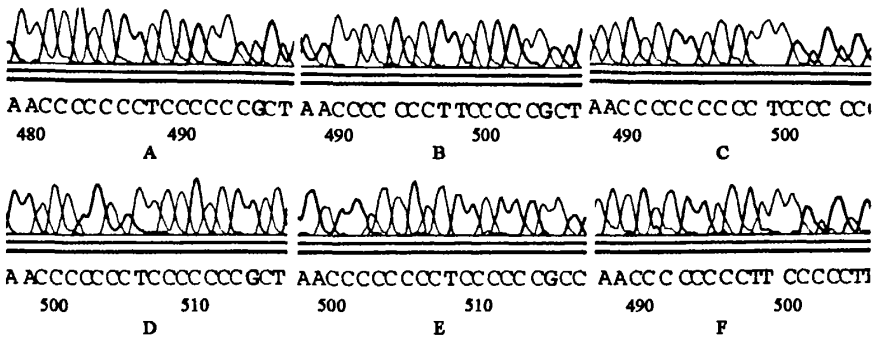


图3 测序结果
 A: D310正常序列 16296 C C C C C C C T C C C C C C C 16309; B: 16304C-T; C: C7-C9; D: C6-C7; E: C7-C8; F: C7-C8, 16304C-T, C6-C5 三种变异同时存在

3 讨论

目前研究发现 D-LOOP 区的碱基突变广泛存在于各种肿瘤组织中,且有较高的发生率。Tong 等^[3]报道在一些实体肿瘤类型中已经检测出线粒体 DNA 的突变,包括胃肠道、乳腺、肺和膀胱癌。线粒体 DNA 突变的类型主要包括碱基的转换,碱基的插入或缺失,以及 D310 的多聚 C 区胞嘧啶的数量的变化。Paola 等^[4]研究 18 例原发性乳腺癌肿瘤组织,在 11 例检测到体细胞突变,其中 5 例是 D-LOOP 区的 D310 部位的多聚 C 区的碱基缺失或插入,而相应的淋巴细胞和正常乳腺组织没有检测到该突变,由此可以推测, D310 部位的突变可能是肿瘤特异性的。Mambo 等^[5]研究也证实发生于肿瘤的体细胞线粒体 DNA 突变大部分定位于 D-LOOP 区,尤其是被称为是 D310 的多聚 C 区。本研究发现喉鳞状细胞癌组织中 D310 区的多聚 C 区胞嘧啶数量的改变发生率为 72.73%,高于 Sanchez-Cespedes 等^[1]报道的 22%。具体突变类型包括:插入 1 个胞嘧啶(6/11),插入 2 个胞嘧啶(2/11),减少 1 个胞嘧啶(2/11),和 16304 位点胞嘧啶 - 胸腺嘧啶转换(2/11),其中一例为 3 种变异同时存在。本研究发现喉鳞状细胞癌细胞线粒体 DNA D310 区域碱基序列改变以单个胞嘧啶的插入最为常见,约占全部变异的 50%。

导致肿瘤细胞 D310 区碱基序列多态性的原因

仍不清楚,可能和线粒体 DNA(尤其是 D-LOOP 区)对外界损伤极其敏感,且缺乏组蛋白保护,缺乏有效的修复机制有关。由于 D310 区的多聚 C 序列是一段保守序列,包含有复制的起点,转录的启动子,该区域的突变,可能会影响线粒体的总体转录水平和蛋白合成,导致线粒体的氧化还原水平受到影响^[6],进一步引起细胞内氧化自由基水平的提高。而氧化自由基可以直接作用于核酸,使之发生碱基的修饰及链的断裂,导致核酸分子的完整性和构型的破坏,影响基因的表达,从而又加重对线粒体蛋白,脂质,酶类及 DNA 的损伤,两个过程相互影响形成恶性循环,引起 D310 区碱基序列的多态性表现。

D310 区碱基序列多态性的临床意义仍存在争议。Lièvre 等^[7]研究认为在头颈肿瘤中可以做为肿瘤的生物标志,用于高危人群的早期筛查。Máximo 等^[8]对甲状腺肿瘤中包括 D310 区域在内的 D-LOOP 区多态性的研究发现,该区域的突变在良性和恶性肿瘤中均存在,且不能认为是恶性肿瘤的标志。在不同组织来源的肿瘤中 D310 区域碱基突变和临床意义存在差异,这可能和线粒体 DNA 的组织特异性有关。喉鳞癌组织中 D310 区碱基突变情况尚未见相关报道,本研究证实喉鳞癌组织中存在很高的线粒体基因 D-310 区碱基序列多态性,提示该区的碱基改变可能和喉鳞状细胞癌的发生,发展有密切关系,但是这些改变的肿瘤学意义,及是否对喉鳞状细胞癌的预后产生影响,需要进一步研究,因此对线粒体 DNA D310 区应予以特别重视。(下转第 309 页)

前连合者,除术前行仔细的临床和影像学评价外,应谨慎行显微喉镜下 CO₂ 激光手术,术后密切随访。

参考文献:

- [1] Shvero J, Koren R, Zohar L, et al. Laser surgery for the treatment of glottic carcinomas[J]. *Am J Otolaryngol*, 2003, 24: 28-33.
- [2] Eckel H E, Thumfart W, Jungehulsing M, et al. Transoral laser surgery for early glottic carcinoma[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2000, 257:221-226.
- [3] Mendehall W M, Werning J W, Hinerman R W, et al. Management of T1-T2 glottic carcinomas[J]. *Cancer*, 2004, 100 (9):1786-1792.
- [4] Remacle M, Eckel H E, Antonelli A, et al. Endoscopic cordectomy. A proposal for a classification by the working committee, European Laryngological Society[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2000, 257:227-231.
- [5] Manola M, Moscillo L, Costa G, et al. Conservative laser microsurgery for T1 glottic carcinoma[J]. *Auris Nasus larynx*, 2008, 35:141-147.
- [6] Pradhan S A, Pai P S, Neeli S I, et al. Transoral laser surgery for early glottic cancers [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 129:623-625.
- [7] Shapshay S M, Wang Z, Rebeiz E E, et al. A combined endoscopic CO₂ laser and external approach for treatment of glottic cancer involving the anterior commissure: An animal study[J]. *Laryngoscope*, 1996, 106:273-279.
- [8] Bagatella F, Bignardi L. Behavior of cancer at the anterior commissure of the larynx[J]. *Laryngoscope*, 1983, 93:353-356.

(编辑:李伟)

(上接第 306 页)

参考文献:

- [1] Sanchez-Cespedes 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.
- [2] 韩月臣,孔维佳,张松,等.喉鳞状细胞癌组织中线粒体基因 4977bp 缺失突变的检测[J]. *癌症*, 2004, 23 (11): 1297-1301.
- [3] Tong B C, Ha P K, Dhir K, et al. Mitochondrial DNA alterations in thyroid [J]. *Cancer J Surg Oncol*, 2003, 82(3):170-173.
- [4] Parrella P, Yan X, Fliss M, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20):7623-7626.
- [5] Mambo E, Gao X, Cohen Y, et al. Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1838-1843.
- [6] Tan D J, Bai R K, Wong L J, et al. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62:972-976.
- [7] Lièvre A, Blons H, Houllier A M, et al. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(5):692-697.
- [8] Máximo V, Lima J, Soares P, et al. Mitochondrial D-Loop instability in thyroid tumours is not a marker of malignancy[J]. *Mitochondrion*, 2005, 5(5):333-340.

(编辑:李伟)