

· 论 著 ·

肺癌中线粒体转录因子 A 的表达及意义^{*}

戴纪刚,肖颖彬,闵家新,张国强,张在永[△]

(第三军医大学新桥医院胸心外科,重庆 400037)

摘 要:**目的** 探讨肺癌组织中线粒体转录因子 A(mtTFA)的表达及意义。**方法** 采用 RT-PCR 等方法,对肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的表达进行检测和分析。**结果** 肺癌组织 mtTFA mRNA 的平均表达量(mtTFA/ β -actin)为 3.029 ± 1.177 ,而相应的正常肺组织平均表达量为 2.917 ± 0.963 ,前者虽略高于后者,但差异无统计学意义($P=0.221$)。**结论** 肺癌中 mtTFA 等线粒体 DNA(mtDNA)转录、复制的调节因子的表达水平可能与 mtDNA 拷贝数的改变无关。

关键词:线粒体 DNA;肺癌;拷贝数;线粒体转录因子 A

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.004

中图分类号:R734.1;R730.23

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2855-03

Study on expression level of mtTFA in lung carcinoma^{*}

DAI Ji-gang, XIAO Ying-bin, MIN Jia-xin, et al.

(Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:**Objective** To study the expression level of mtTFA in lung carcinoma and its significance in the development of cancer.**Methods** The mean mRNA level of mtTFA in matched lung carcinoma/adjacent histologically normal lung tissue samples from patients was analyzed by RT-PCR technique.**Results** The mean mRNA level of mtTFA in lung carcinoma tissue samples and adjacent histologically normal lung tissue samples had no statistical differences($P=0.221$).**Conclusion** The mRNA level of mtTFA is not correlated with the change of copy number of mitochondrial DNA in lung carcinoma.

Key words:mtDNA;lung cancer;copy number;mtTFA

糖的有氧代谢减弱而无氧酵解明显增强是肿瘤细胞的一个共同特点。对缺氧条件的适应是肿瘤进一步发展非常关键的一步。在大多数实体性肿瘤中,这种能量代谢的改变和线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数和氧化磷酸化相关酶活性的降低有着密切的联系。目前,已在肝癌、肾癌、结肠癌和乳腺癌等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现 mtDNA 拷贝数和线粒体酶活性降低^[1-3]。有关 mtDNA 转录和复制的具体机制目前尚不清楚,许多因素可能影响到 mtDNA 的拷贝数。线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)是由核基因编码的一种小分子多肽,是一种能够影响线粒体转录和复制的重要的调节因子。肺癌组织中,mtTFA 的表达有何改变、它与 mtDNA 拷贝数变化有何关系尚未见文献报道。本文采用 RT-PCR 等方法,对肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的表达量进行了检测和分析。

1 材料与方法

1.1 一般资料 37 例肺癌组织和 37 例癌旁肺组织标本均取自第三军医大学新桥医院 2003~2004 年外科手术患者,均经病理检查确诊。癌旁肺组织标本为同一患者病灶远端 5 cm 以上的正常肺组织,均经组织学诊断,证实其没有癌细胞。本组患者男 28 例,女 9 例,吸烟及曾经吸烟者 24 例(吸烟者为每天吸烟 10 支以上且吸烟时间超过 1 年,24 例中包括曾经吸烟现戒烟 1 年以上者 9 例),不吸烟者 13 例。患者年龄 30~75 岁,

中位 55 岁。组织学病理分型情况为鳞状细胞癌 23 例,腺癌 14 例。

1.2 总 RNA 提取及鉴定 所收集的标本用 Trizol 试剂提取总 RNA,按说明书进行,RNA 样品经适当稀释后于紫外分光光度仪上进行测定,记录 A260/A280、蛋白质(g/L)、RNA 浓度($\mu\text{g/mL}$)和纯度(%)。根据 RNA 浓度计算实际收获的 RNA 产量:即 $\text{RNA}(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times 0.05$ 。琼脂糖凝胶电泳对 RNA 样品进行检测,电泳结束后,取出凝胶,置于凝胶呈像仪上观察结果,并拍照。

1.3 RT-PCR 分析目的基因的 mRNA 稳态水平

1.3.1 逆转录合成 cDNA 逆转录反应用日本宝生物公司 TaKaRa RT-PCR Kit(AMV),按要求操作。反应总体积为 40 μL ,混匀,稍微离心。按以下条件进行反转录反应:30 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min,99 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,5 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,终止反应,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。同时设立阴性对照,即用 DEPC 去离子水代替样品总 RNA。

1.3.2 目的片段的 PCR 扩增 根据 GenBank BC001987 序列设计扩增 mtTFA 的引物,以看家基因 β -actin 作为内对照,所有引物由上海基康生物技术有限公司合成,具体见表 1。PCR 反应体系 50 μL ,包括 cDNA 2 μL ,mtTFA 片段上、下游引物(10 pmol/ μL)各 1.8 μL , β -actin 上、下游引物(8 pmol/ μL)各 1.5 μL ,10 \times buffer 5 μL ,MgCl₂(25 mmol/L)4 μL ,dNTP Mix-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900173);重庆市自然科学基金资助项目(2009C195)。 [△] 通讯作者,电话:13983122867;E-mail:691057831@qqcom。

ture(2.5 mmol/L)8 μ L,Taq 酶 1 U。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s,反应 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 终止反应,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 引物序列和扩增长度

目的基因	引物	序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
β -actin	前引物	TTCGAGCAAGAGATGGCCA	270
	后引物	TACATGGTGGTGCCGCC	
mtTFA	前引物	GGAATGTGGAGCGTGCTAAAA	118
	后引物	TGCTGGAAAAACACTTCGGAATA	

1.3.3 RT-PCR 产物鉴定及半定量分析 取样品 2 μ L 与 2 μ L 上样液混合后点样,10 V \times 10 min、30 V \times 20 min 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察,凝胶成像系统扫描存盘。记录各条带积分光密度(IOD),将检测基因与自身 β -actin 条带 IOD 相比较得到其相对 IOD。

1.4 统计学方法 使用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 总 RNA 提取质量鉴定结果 RNA 提取结果显示:RNA 样品浓度为 2~6.5 μ g/ μ L,OD260/OD280 为 1.85~1.97。经电泳后 RNA 中 28、18、5S 3 条带清晰可见,说明 RNA 提取质量合乎要求,可以用于 RT-PCR 实验,见图 1。

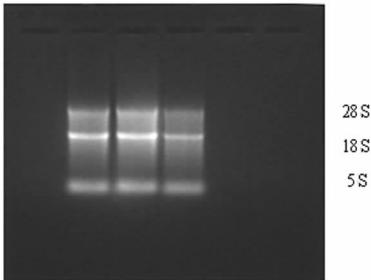


图 1 组织样本总 RNA 样品电泳图谱

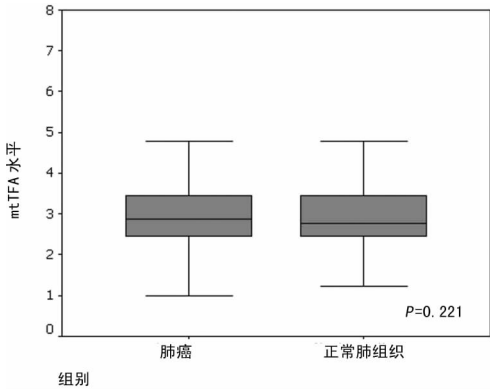
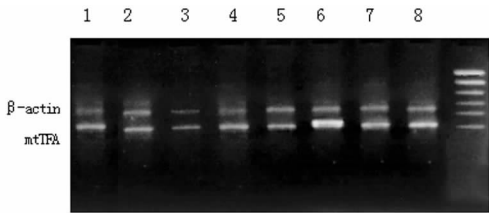


图 2 肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的平均表达水平

2.2 肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 的表达水平 RT-PCR 结果显示,肺癌组织 mtTFA mRNA 的平均表达量(mtTFA/ β -actin)为 3.029 ± 1.177 ,而相应的正常肺组织平均表达量为 2.917 ± 0.963 ,见图 2、3。前者虽略高于后者,但差

异无统计意义($P=0.221$)。



1、3、5、7 为肺癌组织,2、4、6、8 为相对应的癌旁组织。

图 3 肺癌及相应正常肺组织中 mtTFA mRNA 表达水平 RT-PCR 半定量分析

3 讨 论

mtDNA 独立于细胞核 DNA 外,能独立进行复制、转录和翻译,具有非常活跃的自我复制能力。它编码的蛋白质是 ATP 酶和呼吸链复合物的组分,并与核基因编码的蛋白质和酶共同完成生物氧化功能。mtDNA 为多拷贝基因组,体细胞中可含有数十个到数千个 mtDNA 分子。呼吸链的正常组合和运转需要一个完整和功能性的线粒体基因组,而 mtDNA 功能的完成既依赖于每一个 mtDNA 分子结构的完整性,也同时依赖于细胞中 mtDNA 的拷贝数。

线粒体功能缺陷是肿瘤细胞的重要特征之一,肿瘤细胞线粒体在分子、生化、代谢和遗传水平上明显区别于正常细胞,较低的线粒体活性是肿瘤细胞耐受缺氧和对环境条件的一种适应。大多数实体性肿瘤中,能量代谢的改变和 mtDNA 拷贝数和氧化磷酸化相关酶活性的降低有着密切的联系。目前,已在肝癌、肾癌、结肠癌和乳腺癌等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现 mtDNA 含量和线粒体酶活性降低^[1-3]。肿瘤细胞中 mtDNA 含量降低的机制目前尚不清楚,从理论上讲,细胞中线粒体数量、mtDNA 自身遗传结构的改变以及有关 mtDNA 转录、复制的核调节因子表达等因素可以引起 mtDNA 含量的改变。

有关 mtDNA 拷贝数如何控制的研究已进行了数十年,虽然发现和鉴定了许多与 mtDNA 复制有关的调节因子,但对复制过程的具体机制了解得还不多。参与 mtDNA 复制的重要因子包括 mtTFA、单链 DNA 结合蛋白(Single-stranded-DNA-binding-proteins, mtSSB)、RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNA pol)和线粒体 RNA 加工复合物(mitochondrial RNA processing complex, MRP)等,所有这些因子均由核基因组编码。mtDNA 复制起始阶段,需要合成一个 RNA 引物,mtTFA 和 RNA pol 参与了这一过程,而 MRP 负责对这一引物进行进一步加工和处理。此后在 mtSSB 的帮助下,DNA 聚合酶继续完成 mtDNA 的复制过程^[4]。

哺乳动物 mtTFA 是一种由核编码的相对分子质量约为 25 kD 的小分子多肽,是 HMG(the high mobility group domain family)家族中的一员。它由 2 个氨基末端 HMG 功能区、1 个连接区和 1 个羧基末端尾组成。与 HMG 家族中的其他蛋白一样,mtTFA 蛋白能有效地结合、展开和弯曲 DNA 链。每个 HMG 功能区都有 DNA 结合功能,虽然 mtTFA 对 mtDNA 控制区内的重链、轻链启动子具有高度的亲和力,但并没有特别的序列特异性。过去,人们通常认为,mtTFA 蛋白的表达主要是诱导 mtDNA 的转录,与 mtDNA 的复制无关^[5]。目前的研究表明,与 mtSSB 一样,mtTFA 蛋白的表达直接调节 mtDNA 的拷贝数。Ekstrand 等^[6]通过基因敲除和基因转染等方法发现,在各种鼠组织中,mtDNA 的拷贝数和 mtTFA 蛋白的表达

量呈显著正相关。

近年来研究发现,mtTFA 在快速增长的肿瘤中表达上调,可能参与调控与肿瘤发生、发展有关的基因的表达。mtTFA 能够特异性地识别并结合损伤的 mtDNA,结合后,抑制了修复酶对 mtDNA 损伤的识别和结合。此外,mtTFA 还能同 p53 相互作用在凋亡中发挥重要作用。因此,mtTFA 可能与肿瘤发生、发展有较为密切的关系。肿瘤细胞中,控制 mtDNA 转录、复制的调节多肽的表达有何变化? 其与肿瘤 mtDNA 拷贝数的改变有何关系? 这些问题鲜见文献报道。Yin 等^[7]利用竞争 PCR 及定量 PCR 等技术检测了 18 例肝癌 mtDNA 拷贝数的改变,并分析了这种变化与肝癌 mtSSB mRNA 表达量的关系。mtSSB 是调控 mtDNA 复制、修复和重组过程中的一种关键蛋白,目前已证实,正常组织中这种蛋白的表达量和 mtDNA 的含量之间呈显著的正相关^[8]。而 Yin 等^[7]的研究却发现,癌组织中 mtSSB mRNA 的平均表达量与癌旁正常组织相比虽然明显上调,但女性患者癌组织 mtDNA 平均拷贝数却显著低于相应正常组织,男性患者癌组织 mtDNA 平均拷贝数无明显变化;mtSSB mRNA 表达量和 mtDNA 拷贝数之间的相关性只存在于癌旁正常组织中,而癌组织中这种相关性消失。在本研究中,作者利用 RT-PCR 技术检测了 37 例肺癌及相应癌旁组织 mtTFA mRNA 的表达。结果发现,癌组织与癌旁正常组织 mtTFA mRNA 的平均表达量之间差异无统计学意义($P>0.05$)。上述结果说明,在这些肿瘤中,mtDNA 拷贝数虽然下降,但调控 mtDNA 转录、复制的主要调节因子如 mtSSB、mtTFA 的表达并没有显著下调。肿瘤中 mtDNA 拷贝数的改变与 mtDNA 转录、复制的主要调节因子的表达水平无关。肿瘤细胞中 mtDNA 拷贝数改变的具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Meierhofer D, Mayr J A, Foetsch U, et al. Decrease of mi-

tochondrialDNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(6):1005.

[2] Mambo E, Chatterjee A, Xing M, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer[J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(6):920.

[3] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23:759.

[4] Cote J, Ruiz-Carrillo A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G [J]. *Science*, 1993, 261:765.

[5] Bogenhagen DF, Wang Y, Shen EL, et al. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2:1205.

[6] Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13:935.

[7] Yin PH, Lee HC, Chau GY, et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90 (12): 2390.

[8] Ruiz De Mena I. Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:13628.

(收稿日期:2010-04-18)

(上接第 2854 页)

apeutic potential of IFN- γ modied dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(1):13.

[6] 石庆凤,陈敏,曾维群,等. HBV 无症状携带者树突状细胞的分化及功能研究[J]. *重庆医学*, 2009, 38(7):821.

[7] 史蓉华,范娅涵,赵树铭,等. 人外周血富集白细胞层来源的树突状细胞的培养与鉴定[J]. *重庆医学*, 2009, 38(10):1195.

[8] 王海权,徐皓. 联合应用未成熟树突状细胞和 CD40L 单克隆抗体延长大鼠移植肠存活时间[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2006, 26(7):516.

[9] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9:271.

[10] Jurgens B, Hainz U. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2, 3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells [J]. *Blood*, 2009, 114(15):3235.

[11] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21:685.

[12] Chen Y, Chen J, Liu Z. Relationship between Th1/Th2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in

rats[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(8):2691.

[13] Williams CA, Harry RA, Mcleod JD, et al. Apoptotic cells induce dendritic cell-mediated suppression via interferon-gamma-induced IDO[J]. *Immunology*, 2008, 124(1):89.

[14] Mascarell L, Lombardi V, Louise A, et al. Oral dendritic cells mediate ntigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4⁺T cells[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(3):603.

[15] Sagoo P, Lombardi G. Regulatory T cells as therapeutic cells[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008, 13(6):645.

[16] 刘加洪,姚艳红,王英年,等. Th1/Th2 平衡失调与人类疾病关系及其相关治疗研究现状[J]. *青岛大学医学院学报*, 2002, 38(4):366.

[17] Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3(+) regulatory T cells[J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 54(h2):69.

[18] Van Duivenvoorde LM, Van Mierlo GJ, Boonman ZF, et al. Dendritic cells: vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. [J]. *Immunobiology*, 2006, 211(6-8):627.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-07-30)