

人肝癌 SMMC-7721 细胞株部分线粒体基因表达的研究

王 洁,王学敏*,龙建纲,于 军,汪振诚,焦炳华
(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:观察人肝癌 SMMC-7721 细胞株部分线粒体 DNA(mtDNA)基因表达的情况。方法:根据人线粒体 DNA(mtDNA)基因序列,利用 primer premier 5.0 生物软件设计了 4 对 PCR 引物,分别是扩增 D-loop 区、ND6、ATPase8-ATPase6、16sRNA 基因,采用 RT-PCR 方法对 SMMC-7721 细胞线粒体 DNA 上 D-loop 区及其他 3 个基因的表达进行了检测,并与其在正常人肝细胞株(L0₂)线粒体中的表达作了比较。结果:我们发现,与正常人肝细胞株(L0₂)相比,在 SMMC-7721 细胞中,D-loop 区、ND6、ATPase8-ATPase6 基因表达总体是增高的,16sRNA 基因表达基本不变,同时在同一基因两条链(重链和轻链)之间的表达也存在差异。结论:我们认为,由于线粒体 DNA 编码的多肽均是氧化磷酸化酶复合物的亚单位,这些基因表达的异常可能造成细胞对氧利用障碍,细胞能量产生减少,成为造成 SMMC-7721 细胞主要以糖酵解的方式提供能量的重要原因之一。

[关键词] DNA,线粒体;基因表达;肝肿瘤
[中图分类号] R 735.7 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0046-05

Mitochondria gene expression in human liver cancer cell line SMMC-7721

WANG Jie,WANG Xue-min*,LONG Jian-gang,YU Jun,WANG Zhen-cheng,JIAO Bing-hua (Department of Biochemistry and Molecular Biology,College of Basic Medical Sciences,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China)

[ABSTRACT] Objective:To observe the mitochondria gene expression in human liver cancer cell line SMMC-7721. Methods: Four pairs of primers for multiple PCR were designed according to the sequence of human mtDNA with primer premier 5.0 bio-soft. The primers were then used to amplify D-loop region and the gene ND6, ATPase8-ATPase6 and 16sRNA. The expression of D-loop region and the 3 genes of mtDNA in SMMC-7721 was measured by RT-PCR,and the results were compared with those in normal human liver cells(L0₂). Results: Compared with those in L0₂ cells, the expression of the D-loop region,ND6,AT- Pase8-ATPase6 and 16sRNA subunits in SMMC-7721 cells was increased,and the expression of 16sRNA subunit remained un- changed. Meanwhile, there was difference in the transcription of H-strand and L-strand of a certain gene. Conclusion: The mtD- NA-encoded polypeptides are enzyme complex subunits of the oxidative phosphorylation compound,and their aberrant expression harms the oxidative phosphorylation capacity of cells and leads to decreased synthesis of ATP,which may be one of the reasons for glycolysis of SMMC-7721 cells.

[KEY WORDS] DNA,mitochondrial; gene expression; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ,2006;27(1):46-50]

线粒体 DNA(mtDNA)与肿瘤之间存在着密切的关系,无论是肿瘤的发生、发展,还是肿瘤细胞的凋亡,都与 mtDNA 密切相关。目前,关于各种肿瘤中线粒体 DNA 变化的研究越来越多,包括有 mtDNA 致癌机制的研究,各种肿瘤细胞中 mtDNA 的突变,及其编码的各种基因表达的研究。已知 mtDNA 与细胞氧化磷酸化功能密切相关,线粒体是细胞能量生成和储存的重要场所,在该处经氧化磷酸化的方式将能量转化为 ATP 高能键,所以 mtD-NA 的任何变异可能损害氧的利用,导致细胞的氧化和减少代谢能量的产生。

本实验以正常人肝 L0₂ 细胞株为对照,用 RT-PCR 方法对 SMMC-7721 细胞有代表性的几段基因的表达情况进行了检测和分析,探讨这些基因的表达在正常肝细胞和 SMMC-7721 细胞之间是否有所

不同。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和主要试剂 人肝癌 SMMC-7721 细胞株(本室保存),正常人肝细胞 L0₂(长海医院中医科提供)。SMMC-7721 细胞用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液(Gibco 公司),L0₂ 细胞用含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司),

[基金项目] 国家自然科学基金(30171030,30472175);中国博士后科学基金(2004036014)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30171030,30472175) and China Postdoctoral Science Foundation(2004036014)。

[作者简介] 王 洁,硕士生。E-mail:wangjie@126.com
* Corresponding author. E-mail:wang_xuemin@hotmail.com

在 37℃ 恒温条件下,95%空气+5%CO₂于美国 Forma Scientific 公司二氧化碳培养箱中培养,生长密度约为 1.6×10⁶/ml,0.25%的胰蛋白酶 37℃ 消化 1 min,轻轻吹打使团状细胞分散,以需要的密度传代细胞,2 d 换液 1 次,3 d 传代 1 次。TRIzol Reagent (Invitrogen 公司),逆转录试剂均由 TaKaRa 公司提供,包括有 AMV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂等。

表 1 mtRNA 中 PCR 扩增所用到的引物对
Tab 1 Primer pairs used for PCR-amplification of mtRNA

Site	Primer	Sequence(5'→3')	T _m (T/℃)	Product(bp)
D-loop	L1	CCC TTA AAT AAG ACA TCA CGA TG	56.6	426
	R1	GTT AGT TGG GGG GTG ACT GT	60.3	
ND6	ND6L	CTC CTA ATC ACA TAA CCT ATT CCC	58.6	524
	ND6R	TTT CTG TTG AGT GTG GGT TTA GTA	56.8	
ATPase8/6	ATPase L	CCT CTT TAC AGT GTT ATG CCC	58.0	841
	ATPase R	CAG GTA GAG GCT TAC TAG AAG TGT	60.3	
16SrRNA	16S L	TCC TAA ACT ACC AAA CCT GCA TT	56.6	437
	16S	RGG TGG GTG TGG GTA TAA TAC TAA G	60.3	

1.3 细胞 mtRNA 的分离

1.3.1 线粒体的分离 将细胞以胰酶消化后,用培养液收集在 Eppendorf 管中,2 000 r/min 离心 3 min 收集细胞于管底;以适量 TBS 缓冲液洗涤 1 次,离心,再以 STE 缓冲液洗涤 1 次,离心收集细胞,2 000 r/min,3 min;于细胞沉淀中加入适量分离介质(0.25 mol/L 蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl,0.5 mmol/L EDTA, pH 7.4),混匀并转移至匀浆器中匀浆;高速匀浆 15~30 s;将匀浆液于 4℃,1 000×g,离心 10 min,取上清,重复 2~3 次;将上步所得上清合并,4℃,10 000×g 离心 10 min,所得棕色沉淀即为线粒体。

1.3.2 mtRNA 的抽提^[1] 在线粒体中加入适量 TRIzol 试剂(约 500 μl),用 TiP 头吹打 20~30 次,最后用振荡器混匀;室温静置 5~10 min,使 TRIzol 充分发挥作用;加入 100 μl 氯仿,剧烈振荡 10 min,振荡器混匀;4℃ 13 000 r/min 离心 15 min,小心将上层水相移置一个新的 Eppendorf 管中;加入 2 倍体积无水乙醇,于-20℃ 过夜;次日,以 13 000 r/min,4℃,离心 30 min,取沉淀。空气晾干后,50 μl DEPC 处理过的水重溶,用 DNase I 酶(TaKaRa 公司提供)消化去除其中的 DNA,-70℃ 保存。

1.4 PCR 为了检测所得的 mtRNA 中是否混有核 DNA 和 mtDNA ,我们分别以 4 对被检测基因的引物和核 DNA 中特有的基因 18SrRNA 的引物(18S-1: GCT TTC TAC CTA CAT GGT TGA TC;18S-2: GGC CTC GAA AGA GTC CTG TA)进行了 PCR 反应,未发现有 DNA 污染。25 μl PCR

PCR 试剂也是由 TaKaRa 公司提供。

1.2 PCR 引物设计 根据人 mtDNA 基因序列(www.mitomap.org)和 primer premier 5.0 设计了 mtDNA 上的 4 对引物(表 1),并在 BLAST 上进行了同源性分析,以排除核 DNA 中 mtDNA 假基因的干扰。

反应体系如下:mtRNA 模板 1 μl,引物 1 0.5 μl,引物 2 0.5 μl,1×PCR 缓冲液,dNTP 100 μmol/L,Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司提供)2.5 U,反应过程见表 2。

表 2 PCR 扩增条件
Tab 2 Condition for PCR amplification

Site	PCR amplification
D-loop	94℃ 5 min;94℃ 40 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,19 cycle;72℃ 7 min
ND6	94℃ 5 min;94℃ 40 s,53℃ 30 s,72℃ 40 s,19 cycle;72℃ 7 min
16SrRNA	
ATPase8/6	94℃ 5 min;94℃ 40 s,57℃ 30 s,72℃ 51 s,19 cycle;72℃ 7 min
18SrRNA	94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,19 cycle;72℃ 5 min

1.5 RT-PCR 由于 RT-PCR 是半定量的方法,我们对 PCR 的循环数进行了筛选,进行了 13、19、25 个循环数的 PCR,以控制在达到反应平台期之前,最后将循环数定在 19 个循环。

1.5.1 cDNA 链的合成 将抽提出来的 mtRNA 进行第一步,cDNA 链的合成(TaKaRa AMV RT-PCR kit),5 μl 的反应体系:模板 RNA 1 μg,1×AMV buffer,dNTPmix 1 μl(2.5 mmol/L),特异引物(以表 1 中 4 个目的基因的 8 条引物分别作为合成引物)5 pmol/L,RNase inhibitor 0.5 μl,AMV RTase 0.5 μl。逆转录反应条件为:42℃ 水浴 1 h,95℃ 水浴 5 min,以灭活逆转录酶终止反应。以 2 倍体积的 2.5 mol/L NH₄Ac 和 3 倍的无水乙醇将逆转录产物沉淀纯化,以便去除过量的引物和 dNTP,重复 2 次^[1]。

1.5.2 PCR 以纯化后的逆转录产物为模板进行第二步 PCR,25 μ l 的反应体系:模板 1 μ l,目的基因的 2 条引物(表 1)各 0.5 μ l,1 $\times$ PCR buffer,dNTP 2 μ l(2.5 mmol/L),ddH₂O 18.3 μ l,Taq DNA 聚合酶 2.5 U。具体反应条件如表 2。将所扩增出来的 PCR 产物上样于含 0.5 g/L EB 的 2%碱性琼脂糖凝胶电泳,80 V/cm,电泳 30 min,紫外灯下观察结果并照相。然后用全自动凝胶图像分析系统(天能凝胶图像处理系统 Tanon GIS-1000)进行条带分析。

2 结 果

2.1 细胞 RNA 纯度鉴定 分光光度计检测 mtRNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的光密度比值, D_{260}/D_{280} 为 1.8,表明 RNA 样品纯度较高。

2.2 mtRNA 纯度鉴定 为了检测 mtRNA 中是否混有核 DNA 和 mtDNA,我们分别以 18SrRNA 和待测 4 对基因的引物,直接以所抽的 mtRNA 为模板进行 PCR。将所得条带在 2%碱性琼脂糖凝胶上电泳鉴定,结果如图 1 中所示,在各自对应的位置均未见扩增出的条带(均只有引物二聚体),说明所抽得的 mtRNA 并未受到核 DNA 和 mtDNA 的污染。

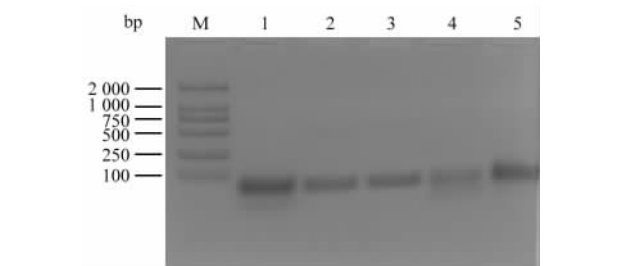


图 1 以 mtRNA 为模板进行 PCR 扩增的电泳结果
Fig 1 Electrophoresis of PCR products of mtRNA
1:18SrRNA; 2:ND6; 3:16SrRNA; 4:D-loop; 5:ATPase8/6; M: Marker

2.3 PCR 循环数的确定 由于 13 个循环数并没有扩增出条带,所以图 2、3 分别是 19 和 25 个循环数的 PCR 扩增结果。从这两张图可以看出,随着 PCR 循环数的增加,产物的量也随之增加,但 ND6(L)却始终没有扩增出产物。说明 25 个循环数之前扩增仍处在指数期,而未达到平台期。所以,我们将 PCR 循环数定在 19 个循环数。

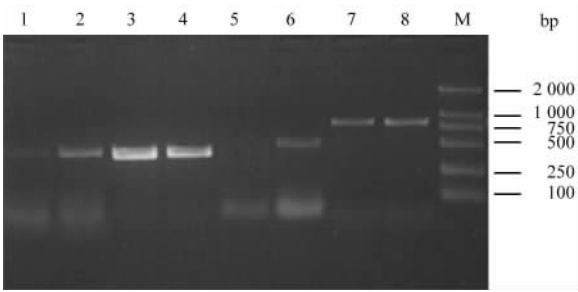


图 2 19 个循环扩增出的 RT-PCR 结果
Fig 2 Results of RT-PCR amplification after 19 cycles
1:L1;2:R1;3:16S(R);4:16S(L);5:ND6(L);6:ND6(R);7:ATP(L);8:ATP(R);M:Marker

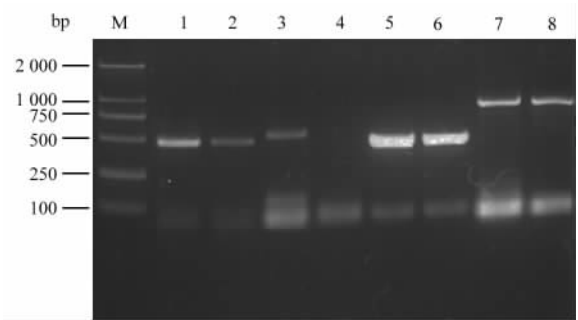


图 3 25 个循环扩增出的 RT-PCR 结果
Fig 3 Results of RT-PCR amplification after 25 cycles
M:Marker;1:L1;2:R1;3:ND6(R);4:ND6(L);5:16S(R);6:16S(L);7:ATP(R);8:ATP(L)

2.4 SMMC-7721 细胞及正常人肝细胞 L0₂ 待测基因表达的检测 将抽提出的 mtRNA 以 RT-PCR 的方法检测其相应基因的表达,电泳结果如图 4 和图 5 所示。

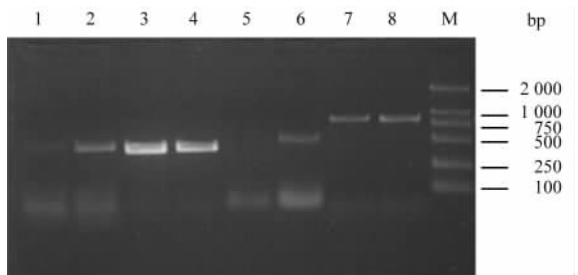


图 4 SMMC-7721 细胞线粒体中 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳图
Fig 4 Electrophoresis of RT-PCR products of mitochondria mRNA of SMMC-7721 cells
1:L1;2:R1;3:16S(R);4:16S(L);5:ND6(L);6:ND6(R);7:ATP(L);8:ATP(R);M:Marker

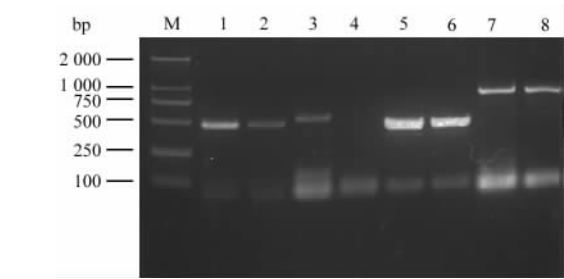


图 5 L0₂细胞线粒体中
mRNA RT-PCR 扩增产物电泳图

Fig 5 Electrophoresis of RT-PCR products of
mitochondria mRNA of L0₂ cells

M:Marker;1: ND6(R);2: ND6(L);3: ATP(R);4: ATP(L);5:
16S(R);6: 16S(L);7: L2;8: L1

利用凝胶成像系统分析 SMMC-7721 细胞及正常人肝细胞 L0₂ 待测基因 RT-PCR 电泳条带的灰度值,可以更直观地了解这些基因表达的差别(表 3)。

表 3 SMMC-7721 细胞和 L0 ₂ 细胞电泳结果比较		
Tab 3 Comparison of electrophoresis of SMMC-7721 cell and L0 ₂ cell products		
Gene	SMMC-7721 cell	L0 ₂ cell
L1	161	82
R1	196	116
16S(L)	250	242
16S(R)	249	240
ND6(L)	-	65
ND6(R)	134	70
ATPase(L)	101	68
ATPase(R)	119	86

结合电泳图和灰度值的比较,我们发现,与正常肝细胞(L0₂)相比,在 SMMC-7721 细胞中,D-loop 区、ND6、ATPase8-ATPase6 基因表达总体是增高的,16sRNA 基因表达基本不变,但 ND6(L)的产物是“缺失”的,也就是说,ND6 基因中以轻链(L 链)上的引物逆转录后未扩增出产物。同时,在同一基因两条链(重链和轻链)之间的表达也存在差异。

3 讨论

和正常组织相比,肿瘤细胞含有更少的线粒体^[2,3],推测肿瘤细胞线粒体的减少有可能会引起线粒体基因表达的减少,这有可能是细胞癌变的一种反应^[4,5]。但是,还存在着另一种与之矛盾的观念——癌细胞中线粒体基因的表达是增强的^[4,6,7]。在实体瘤中,mtDNA 上编码电子呼吸链亚基的基因

表达是增高的,这可能会影响到线粒体对细胞中能量需求受到干扰的适应^[6]。增强的 mtRNA 水平也很可能会影响肿瘤细胞的凋亡,并由此而导致肿瘤细胞的过度生长^[6]。如此看来,肿瘤细胞中 mtDNA 含量的增多还是减少,以及 mtDNA 基因转录水平的特异性改变可能会成为一种肿瘤新的标志物。有报道说,不同的肿瘤类型会出现不同的基因表达,这可能与特定的肿瘤类型有关^[8~10]。

我们所研究的人肝癌株 SMMC-7721 细胞中 D-loop 区及这几个基因的表达,目前并没有看到有相关报道。从所得到的结果来看,与正常肝细胞 L0₂ 比较,所测的 D-loop 区和编码 ND6,ATPase8/6 基因表达量均是增高的,这点与文献中报道的肝癌细胞中复合体 I (ND2,ND5)、复合体 IV (cyt-c 氧化酶 I 和 II)表达增高的趋势是一致的。而 16SrRNA 基因的表达基本没有变化,认为可能与 16SrRNA 基因的保守性有关。还发现 ND6 基因的表达不同于其他的基因,ND6 的编码基因是惟一存在于 L-链上的,在 SMMC-7721 细胞中它并不表达,而相对应的 H-链上的基因却是表达的。

我们知道,mtDNA 的转录和核 DNA 不太一样,它起始于 D-loop 区,共有 3 个转录起始位点,H-链有两个,L-链有一个。L-链的转录从 ND6 基因一直到 tRNA^{Gln} 基因,H-链则包括两种情况:从 12SrRNA 基因一直到 tRNA^{Thr} 基因的全长转录;或者终止于 16SrRNA 基因的 3'末端。这就解释了为什么 16SrRNA 基因的表达要明显高于其他基因的表达式。肝癌细胞的过度生长,需要大量的 ATP 能量,但是肝癌细胞中线粒体拷贝数目和内容物都是减少的^[11],这使 mtDNA 上编码氧化呼吸链上酶复合物亚基相应基因的表达发生代偿性增高,以适应细胞这种能量需求的变化。

但为什么在其他基因表达增高的同时,ND6 基因的表达却发生了“缺失”? ND6 基因是编码氧化呼吸链上酶复合物 I -NADH 其中一个亚基的,它的表达的“缺失”也导致了 ND6 蛋白表达的“缺失”,从而很可能引起酶复合物 I 结构和功能的改变。在肿瘤细胞 mtDNA 中复合物 I ND 亚基的变化一直是一个“热点”^[12]。

我们推测由于 ND6 基因表达的“缺失”使酶复合物 I -NADH 结构和功能受到影响,从而影响到细胞氧化磷酸化功能,为了能够在低氧环境中生存,细胞启动了一些代偿机制,如其他基因表达量的增高,还有一点很重要,就是糖酵解产生 ATP 途径的代偿性增高,我们知道癌细胞不像正常细胞,在正常细胞中主要是依靠氧化磷酸化来提供 ATP 能量,而

在癌细胞中则主要通过糖酵解途径来提供能量,并与线粒体氧化磷酸化功能障碍有关,但对其中的机制尚不太清楚。我们认为,在 SMMC-7721 细胞中,ND6 基因不表达很有可能对细胞的氧化磷酸功能不利,使细胞无法从有氧呼吸中得到足够能量,结合癌细胞的厌氧环境,而只能通过糖酵解途径获得能量,并逐渐成为肝癌细胞中获得 ATP 的主要途径^[13]。同时,mtRNA 的增多也使细胞具有抗凋亡的能力^[6],导致细胞的过度增殖。

我们还发现,所有基因都是两条链均参与表达,而不是只有编码该基因相应的那条链才表达。利用凝胶成像系统进行 PCR 条带的灰度分析,编码该基因的 DNA 片段表达量要比所对应的另一条链的表达量高,可是为什么另一条链也会发生转录,并且在正常肝细胞中也存在这种现象?虽然其中的缘由尚不清楚,但相信很有可能与细胞呼吸功能有关。并且非编码区转录出的 RNA 也未降解,H-链表达高于 L-链,分析由于 H-链编码的基因较多,且大部分基因的表达都是增高的,转录很可能较 L-链活跃,造成 D-loop 区内 H-链表达较 L-链高,但为何两条链最终没有被完全降解还不清楚,由于线粒体的“经济性”的特点,不会将没有用的物质保留下来,推测有可能是某些未知的 RNA 的组成部分,或还具有我们所未知的功能。因为从我们的实验看,并不是只有编码基因的 DNA 才表达,SMMC-7721 细胞线粒体中很可能存在一些新的 RNA 片段。所表达出的 mRNA 究竟有多少,片段有多长,其功能是什么,这些都有待于我们进一步的研究。

[参 考 文 献]

[1] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂 主译. 3 版. 北京:科学出版社,2003. 934-936.

[2] Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Mutat Res, 2001, 488: 119-

133.

[3] 韩琤波,李 凡,杨雪飞,等. 胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化[J]. 世界华人消化杂志,2004,12:258-261.

[4] Luciakova K, Kuzela S. Increased steady-state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondria. [J]. Eur J Biochem, 1992, 205: 1187-1193.

[5] 韩琤波,赵雨杰,李 凡,等. 线粒体 DNA 定量和缺失检测及其与肿瘤发生的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2004,26:10-13.

[6] 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, 98:4038-4043.

[7] Savre-Train I, Piatyszek MA, Shay JW. Transcription of deleted mitochondrial DNA in human colon adenocarcinoma cells[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1:203-204.

[8] Lu P, Nakorchevskiy A, Marcotte EM. Expression deconvolution: a reinterpretation of DNA microarray data reveals dynamic changes in cell population[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100:10370-10375.

[9] Killion PJ, Sherlock G, Iyer VR. The Longhorn Array Database (LAD): an open source, MIAME compliant implementation of the Stanford Microarray Database (SMD) [J/OL]. BMC Bioinformatics, 2003, 4, 32. [2005-06-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.

[10] Alonso A, Mahmood R, Li S, et al. Genomic microarray analysis reveals distinct locations for the CENP-A binding domains in three human chromosome 13q32 neocentromeres[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12:2711-2721.

[11] 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, 90:2390-2396.

[12] DeHaan C, Habibi-Nazhad B, Yan E, et al. Mutation in mitochondrial complex I ND6 subunit is associated with defective response to hypoxia in human glioma cells[J/OL]. Mol Cancer, 2004, 3: 19. [2005-06-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.

[收稿日期] 2005-06-01 [修回日期] 2005-10-17

[本文编辑] 尹 茶