

- 8 Gerber BL, Rochitte CE, Melin JA, et al. Microvascular obstruction and left ventricular remodeling early after myocardial infarction. *Circulation*, 2000, 101: 2734-2741.

(收稿日期:2002-03-11)

(本文编辑 李娜)

·论著摘要·

时间温度梯度凝胶电泳结合基因测序对乳腺癌体细胞全线粒体 DNA 扫描及突变检测

谭端军 白仁奎 LJC Wong

目的 线粒体主要通过氧化磷酸化途径以三磷酸腺苷(ATP)的形式产生能量在细胞内发挥作用。它是活性氧产生的主要场所,对 DNA 氧化性损伤十分敏感,同时缺乏保护性组蛋白和有限的 DNA 修复机制,其突变率至少是核基因组的 10 倍以上。线粒体在能量代谢、活性氧产生、衰老和凋亡的起始过程均起着重要作用,提示其在细胞的死亡和异常生长方面有着关键性的作用,可能参与肿瘤的发生过程。本研究目的在于采用新的方法对整个线粒体基因进行扫描,结合基因测序对乳腺癌组织突变情况进行检测。

方法 所有 19 例乳腺癌和癌旁冷冻组织采用蛋白酶 K 和酚、氯仿抽提 DNA,利用 32 对重叠引物 PCR 扩增线粒体 16.6kb 全长基因,采用时间温度梯度变性凝胶电泳技术扫描线粒体全基因,进行初步突变筛选,如发现癌及癌旁正常组织具有不同电泳图谱(如条带的迁移变异或杂合体),则对其进行序列测定明确突变位点。

结果 19 例乳腺癌有 14 例发生突变(74% 阳性),总突变数为 27 个,其中 22 个发生在高变 D 环区(占 81.5%)、1 个位于 16S rRNA 区、4 个在 mRNA 区,其中一个错义突变位于 ATP 合成酶 6 基因(T9131C,氨基酸位点 L122P),其他 3 个同义突变均位于 NADH 脱氢酶 2 基因(T4973C, G5285A,氨基酸位点 G168 和 K272)。6 个肿瘤有 1 个体细胞突变,余下的肿瘤具有多个突变。另外,发现 102 个

种系传代变异,其中 7 个变异出现率在 50% 以上,23 个变异为首次发现,该结果尚未见文献和线粒体基因文库中报道。采用特殊设计的引物进行 PCR 检测,在所有肿瘤中均未发现常见的线粒体 4 977bp 缺失突变。在 11 个微卫星区体细胞线粒体基因不稳定的检测显示其插入和缺失突变仅存在于接近 H 链启动子、且有 7 个多聚 C 存在 D 环区 303~309 位点(4 例、占 21%),在其他微卫星区均未发现任何突变。

讨论 本研究提示乳腺癌组织具有体细胞线粒体 DNA 高突变率,不仅发生在非编码的高变 D 环区,而且也存在于 ATP 合成酶和 NADH 脱氢酶基因编码区。21% 的肿瘤 D 环区 np303~309 发生插入或缺失突变,而其他微卫星区并无突变,提示 303~309 位点的变异可能是肿瘤的突变热点而非真正反映微卫星不稳定。在线粒体基因组中任何位点的突变可能影响线粒体 DNA 复制、转录和翻译的效率。在编码区的基因突变可能产生明显的功能效应,导致肿瘤细胞中突变的线粒体获得生长优势。由于线粒体 DNA 的高拷贝数,因此,体细胞线粒体 DNA 突变的辨别结合临床病理结果,可望为乳腺癌的早期检测和诊断提供良好的分子标志。本研究结果对线粒体 DNA 是否可作为肿瘤治疗的潜在靶点进行评价。

(收稿日期:2002-05-16)

(本文编辑 周国泰)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所(谭端军);Georgetown University Medical Center, Institute for Molecular and Human Genetics, Washington DC. (白仁奎, LJC Wong)

作者简介:谭端军,男,医学博士,副主任医师