

文章编号: 1007-4627(2011)01-0118-04

X 射线辐照引起的线粒体 D310 片段突变的快速检测*

张昕^{1, 2, 3, 4}, 周鑫^{1, 2, 3, 4}, 张红^{1, 2, 3, #}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

4 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用 4 Gy X 射线辐照人乳腺癌细胞 MCF-7, 分别在照射后 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 和 144 h 时间点收集细胞, 提取 DNA 并以聚合酶链式反应进行扩增, 再以 BsaXI 限制性内切酶对扩增产物进行消化, 消化产物以琼脂糖凝胶电泳进行分离。结果表明, 4 Gy X 射线辐照可引起 D310 片段突变, 且该突变在经辐照之后 144 h 检测水平明显超过野生型。

关键词: X 射线辐照; 线粒体 DNA 损伤; D310 片段突变; 聚合酶链式反应

中图分类号: Q345; Q354

文献标识码: A

1 引言

线粒体基因组是哺乳动物细胞内唯一的核外遗传物质, 全长 16569 bp, 共含 37 个基因, 编码 13 种蛋白质, 2 个 rRNA 基因和 22 个 tRNA 基因, 编码产物在氧化磷酸化过程中均有重要作用。人类线粒体基因无内含子序列, 复制和修复都依赖于 γ -DNA 酶。该 DNA 酶修复能力较低, 且线粒体 DNA(mtDNA)为裸露的环状双链分子, 缺乏组蛋白保护, 较核基因组更容易受到电离辐射和活性氧所引起的损伤, 因此突变发生率比核 DNA 高出 10—1000 倍^[1-4]。mtDNA 突变往往导致氧化磷酸化功能紊乱、细胞活力降低、细胞凋亡, 与多种疾病的发病相关, 影响到神经、肌肉等各种组织。因此, 近年来 mtDNA 突变与肿瘤发生渐渐成为众多研究者所关注的问题。

D310 序列位于线粒体基因组的 D-loop 区(Displacement-loop region)。D-loop 区全长约为 1120 bp, 是 mtDNA 复制和转录的重要调控区域。最近的研究表明, D310 序列突变在肿瘤组织中相当普遍, 而 D-loop 突变也被证实在头颈部肿瘤、结肠癌、肺癌、胃癌、肝癌、卵巢癌和子宫浆液性癌等

多种肿瘤细胞当中有明显提高^[5-8]。因此 D-loop 突变, 尤其是 D310 序列突变有望成为肿瘤诊断的分子标记, 作为早期肿瘤发生阶段的检测标记。

目前, 在放射生物学领域关于 D310 序列突变的研究报道较少, 电离辐射对于 D-loop 区以及 D310 序列的影响和检测及其机理等问题尚待阐明。D310 序列内 303—315 bp 之间为一段 12 bp 长度的保守序列, 碱基排序为...CCCCCCTCCCC..., 其中连续的 7 个胸腺嘧啶核苷酸组成的序列被称为 7-C 片段。有研究表明其多态性与肿瘤的发生和形成有一定关系^[9-10]。由于该片段存在限制性内切酶 BsaXI 识别位点, 因此本文以聚合酶链式反应(PCR)扩增结合 BsaXI 限制性内切酶消化, 并以琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行分离的方法对 X 射线辐照所引起的 MCF-7 细胞 D310 片段突变进行定性分析, 并期望借此开发新型、快捷的针对 D310 片段突变的检测方法。

2 材料与方法

2.1 细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7 在生长面积 25 cm² 的细

* 收稿日期: 2010-07-06; 修改日期: 2010-07-21

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB834202); 国家自然科学基金重点项目(10835011); 甘肃省重大科技专项项目(O702NKDA045, O801NKDA001)

作者简介: 张昕(1982—), 男(汉族), 甘肃白银人, 在读硕士生, 从事生物物理研究; E-mail: zhangxin02st@163.com

通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

胞培养瓶中培养, 培养基为添加 10% 小牛血清(兰州民海)的 DMEM(GIBCO), 培养箱温度 37 °C, 并保持 5% 体积分数的 CO₂。细胞统一传代, 培养至对数生长期以进行下一步实验。

2.2 X 射线辐照

MCF-7 细胞的 X 射线辐照在甘肃省肿瘤医院 X 射线加速器终端进行(北京医疗器械研究所, BJ6B E400), 剂量率为 3 Gy/min, 细胞吸收剂量为 4 Gy。照射之后迅速转移至培养箱继续培养, 在照射后不同时间点采集收样, 以备下一步实验。

2.3 聚合酶链式反应(PCR)

(1) 样品收集

分别在照射后 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 和 144 h 时间点以胰酶消化收集细胞, 并以 PBS 冲洗 2 次, 离心之后在 -80 °C 低温冰箱内保存以进行下一步实验。所有样品细胞以 TaKaRa Universal Genomic DNA extract kit 进行 DNA 提取, 以备下一步实验。

(2) 聚合酶链式反应

以聚合酶链式反应扩增以上步骤所提取到的 DNA 样品, D310 序列特异性引物见文献[11], 引物为:

正向引物 5-ACAATTGAATGTCTTGCA-CAGCCACTT-3, 反向引物 5-GGCAGAGATGT-GTTTAAGTGCTG-3。

PCR 反应体系为 50 μl, 包括: DNA 模板 10-ng、200 μM dNTP、12.5 pmol 引物、50 mM KCL、10 mM tris-HCL(PH 9.0)、1.5 mM MgCL₂ 和 1 U Taq DNA 聚合酶(Fermentas)。

PCR 循环条件见文献[11]: 96 °C 变性 90 s, 后续 40 个循环: 96 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72

°C 延伸 30 s, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物收集以进行下一步实验。

(3) BsaXI 内切酶消化

经 PCR 扩增获得产物以 BsaXI 限制性内切酶(Fermentas)进行消化, DNA 模板与含有 3U BsaXI 内切酶的缓冲液, 在 37 °C 孵育 24 h 以保证完全酶切消化, BsaXI 限制性内切酶专一识别位点为:

... NNNNNNNNNNNNNNACNNNNNCTCC-
NNNNNNNNNNNN...

... NNNNNNNNNNNNNNTGNNNNNGAG-
GNNNNNNNNNNNN...

(4) 琼脂糖凝胶电泳

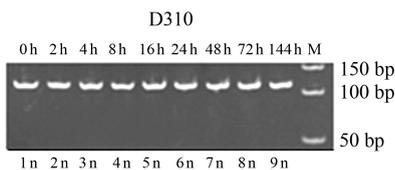
扩增产物经 BsaXI 酶切消化之后, 以 1% 浓度琼脂糖凝胶电泳进行分离, 并以 EB 染色, 用凝胶成像系统进行拍摄(Alpha InnoTech)。

3 结果

3.1 琼脂糖凝胶电泳

由于 D310 序列内包括 BsaXI 限制性内切酶专一识别位点, 因此野生型 D310 片段可被 BsaXI 限制性内切酶识别并且酶切成为两个片段, 分别为 52 和 30/27 bp, 不存在 109 bp 的 D310 扩增条带; 而突变型 D310 序列内的 7-C 片段因突变无法被 BsaXI 限制性内切酶识别, PCR 结果呈现异质性(heteroplasmy), 109 bp 条带与 52, 30/27 bp 扩增条带同时存在^[11]。

琼脂糖凝胶电泳分离未经过 BsaXI 限制性内切酶消化的 PCR 产物表明。X 射线辐照所引起的 D310 序列突变在未经酶切消化的情况下检测不到明显差异(图 1)。



(a)

#	IDV	%*	AREA	AVG	BACK
1 n	44793	11.3	288	156	0
2 n	43812	11.0	288	152	0
3 n	44111	11.1	288	153	0
4 n	42912	10.8	288	149	0
5 n	44407	11.2	288	154	0
6 n	44135	11.1	288	153	0
7 n	44428	11.2	288	154	0
8 n	44682	11.2	288	155	0
9 n	44049	11.1	288	153	0

IDV = Integrated Density Value
* based on Integrated Density Value

(b)

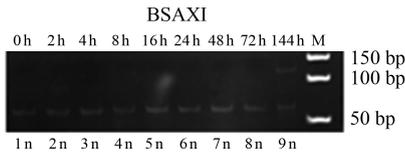
图 1 BsaXI 限制性内切酶(-)对照组琼脂糖凝胶电泳结果(a), FluorChem SP 软件条带密度分析结果(b)

经过 BsaXI 限制性内切酶消化的 PCR 产物以

琼脂糖凝胶电泳进行分离。分离结果表明, 4 Gy X

射线辐照可引起 D310 序列突变,而这种突变在辐照之后随时间积累,在辐照后 144 h 时突变型 D310 片段检测结果明显,109 bp 的全长扩增片段与 30/27 bp 扩增片段同时存在,形成了异质性条带,检测方法对辐照引起的 D310 序列突变较为有效

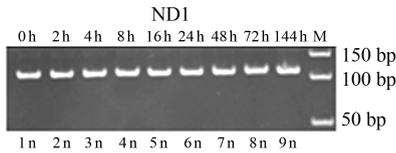
(图 2)。通过对线粒体 ND1 基因(109 bp)的扩增结果对比说明,BsaXI 限制性内切酶对 D310 片段的识别具有专一性,对于非目的基因没有识别,不会对检测结果产生干扰,检测方法可靠(图 3)。



#	IDV	%*	AREA	AVG	BACK
1 n	6760	8.3	276	24	0
2 n	6578	8.1	276	24	0
3 n	6440	7.9	276	23	0
4 n	8270	10.2	276	30	0
5 n	10122	12.5	276	37	0
6 n	10115	12.5	276	37	0
7 n	10756	13.2	276	39	0
8 n	10881	13.4	276	39	0
9 n	11315	13.9	276	41	0

IDV = Integrated Density Value
* based on Integrated Density Value

图 2 BsaXI 限制性内切酶(+)组琼脂糖凝胶电泳结果(a), FluorChem SP 软件条带密度分析结果(b)



#	IDV	%*	AREA	AVG	BACK
1 n	42239	10.7	286	148	0
2 n	42539	10.7	286	149	0
3 n	44450	11.2	286	155	0
4 n	44437	11.2	286	155	0
5 n	44642	11.3	286	156	0
6 n	44391	11.2	286	155	0
7 n	44440	11.2	286	155	0
8 n	44149	11.1	286	154	0
9 n	45158	11.4	286	158	0

IDV = Integrated Density Value
* based on Integrated Density Value

图 3 线粒体 ND1 基因对照组琼脂糖凝胶电泳结果(a), FluorChem SP 软件条带密度分析结果(b)

4 讨论

线粒体 DNA 在肿瘤细胞中存在高频率突变已经得到证实,突变所导致的线粒体功能紊乱不单纯影响到了细胞的能量代谢。最近的研究表明,线粒体 DNA 突变所引起的氧化呼吸链功能抑制在细胞 ROS 生成、细胞信号传导途径改变,以及凋亡信号通路更替有着密切的关系^[12-13],这一系列变化最终会导致细胞逃逸正常凋亡程序并且癌变。线粒体 D-loop 区作为其复制和转录的重要调控区域所发生的突变对线粒体功能必然产生较大的影响。

由于在肿瘤组织细胞中 mtDNA D-loop 区突变较为普遍,在近几年中逐渐引起了研究者的重视,但是已有对于 D-loop 区突变的研究往往都基于常规 PCR 或者直接 DNA 测序^[14]。常规 PCR 对于突变只能做到定性检测;针对突变进行的 DNA 测序工作虽然能对突变产生的多态性进行很好的分析,但是在时间和工作量方面都限制了其使用的范围;使用基因微阵列或者 SNP 测序分析等方法因为成本高和耗时长而难于普及。

根据对研究结果的统计,22%的原发性肿瘤组织样品中都存在 D310 片段的 7-C 序列突变,在甲状腺、乳腺、消化和生殖系统肿瘤中,该序列的突变也已被证实较为普遍^[11, 15-17],因此针对于 D310 序列的突变检测具有一定的代表性。以 BsaXI 限制性内切酶消化结合 RFLP 分析的方法也已被证明在应用于肿瘤组织 D310 序列突变中时非常有效^[11]。本实验采用 PCR 扩增与 BsaXI 限制性内切酶消化的方法对 X 射线辐照引起的 D310 序列突变进行了检测。实验结果表明,该方法灵敏、可靠,并且较为方便,检测成本较低。在本方法定性检测的基础上,如果结合 Realtime PCR 则可以实现对 D310 序列突变的定量即时测定,并且相对更为快捷,可实现大批量检测,对于临床应用检测有一定价值。

实验结果显示,作为 D-loop 内突变热点的 D310 序列在 4 Gy X 射线辐照后产生的突变已经可以被检测到,且这种突变可在辐照之后随时间变化逐渐积累。电离辐射诱导的细胞癌变在肿瘤的临床放射治疗和放射毒性环境评估中历来受到重视,因此本文所采用的方法可被用于检测各种电离辐射所

引起的线粒体 DNA 突变, 为早期监测放射损伤、肿瘤发生提供一定的数据指标。

参考文献 (References):

- [1] Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius, Boris Zhivotovsky. *Trends in Cell Biology*, 2008, **18**(4): 165.
- [2] Jung-whan Kim, Chi V Dang. *Cancer Research*, 2006, **66**(18): 8927.
- [3] Eyal Gottlieb, Ian P M T. *Nature Reviews Cancer*, 2005, **5**: 857.
- [4] Jennifer S C, Huang Peng. *Molecular Cancer*, 2002, **1**(1): 9.
- [5] Helene Simonnet, Nathalie Alazard, Kathy Pfeiffer, *et al.* *Carcinogenesis*, 2002, **23**(5): 759.
- [6] Yujiro Shidara, Kumi Yamagata, Takashi Kanamori, *et al.* *Cancer Research*, 2005, **65**: 1655.
- [7] Min Wu, Andy Neilson, Amy L S, *et al.* *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, **292**: 125.
- [8] Celia H T, Claudia Ferreiro-Barros, Marina Cardeal, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1588**(1): 65.
- [9] Hsin-Chen Lee, Li Shuhui, Lin Jinchang, *et al.* *Mutation Research*, 2004, (547): 71.
- [10] Hsin-Chen Lee, Li-Sung Hsu, Yin Penhui, *et al.* *Mitochondrion*, 2007, **7**(1): 157.
- [11] Aral Cenk, Kaya Handan, Ataizi-Celikel, *et al.* *BMC cancer*, 2006, **6**(1): 21.
- [12] David Meierhofer, Johannes A M, Ulrike Foetschl, *et al.* *Carcinogenesis*, 2004, **25**(6): 1005.
- [13] Hélène Pelicano, Rui-hua Xu, Min Du, *et al.* *Journal of Cell Biology*, 2006, **175**(6): 913.
- [14] Sanches Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, *et al.* *Cancer Research*, 2001, **61**: 7015.
- [15] Parrella P, Xiao Y, Fliiss M, *et al.* *Cancer Research*, 2001, **61**(20): 7623.
- [16] Tong B C, Ha P K, Dhir K, *et al.* *Journal of Surgical Oncology*, 2003, **82**(3): 170.
- [17] Hiyama T, Tanaka S, Shima H, *et al.* *Oncology Reports*, 2003, **10**(6): 1837.

A Novel Approach for Rapid Detection of X-ray Irradiation Induced mtDNA D310 Mutation^{*}

ZHANG Xin^{1, 2, 3, 4}, ZHOU Xin^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Hong^{1, 2, 3, #}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;*

4 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

Abstract: Human breast cancer cell line MCF-7 was irradiated with 4 Gy X-ray, collected at 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 144 h after irradiation, respectively. Whole genome DNA including mtDNA were extracted at each time point, and amplified by polymerase chain reaction(PCR). Then the PCR product was subjected to BSAXI digestion, all of digestion product then underwent a brief electrophoresis. Results showed D310 mutation can be induced by 4 Gy X-ray irradiation and D310 mutation can overwhelm the normal phenotype 144 h after irradiation.

Key words: X-ray irradiation; mtDNA damage; detection of D310 mutation; polymerase chain reaction

* **Received date:** 6 Jul. 2010; **Revised date:** 21 Jul. 2010

* **Foundation item:** Major State Basic Research Development Program of China(973 Program) (2010CB834202); Key Project of National Natural Science Foundation of China(10835011); Key Scientific Technology Research Project of Gansu Province (O702NKDA045, O801NKDA001)

Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn