

研究报告

一氧化氮诱导食管癌细胞线粒体
DNA 编码基因过表达*李恩民^{1)**} 许丽艳²⁾ 杨帆¹⁾ 袁兰³⁾ 陈跃³⁾¹⁾ 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515031; ²⁾ 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515031;³⁾ 北京大学医药卫生分析中心, 北京 100083)

摘要 以人食管癌细胞系 EC109 作为驱赶方 (driver), 以被一氧化氮 (nitric oxid, NO) 诱导的 EC109 作为实验方 (tester), 应用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH)、反向 mRNA 斑点印迹和 RNA 印迹等技术手段研究了 NO 诱导的食管癌细胞中基因的过表达情况。然后对过表达基因的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 实施序列测定, 并与 GenBank 进行 BLAST 同源性比较和序列突变分析。结果先后两次从 69 个 SSH 阳性克隆中共鉴定出 6 个线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 编码的基因, 即 *ND-4L*、*ND-4*、*COX-2*、*Lys-tRNA*、*ATP-8* 和 *ATP-6*。表明 NO 可以诱导食管癌细胞 mtDNA 编码的基因过表达。另外, 在 *ND-4L/ND-4* 基因的片段 (10 736~11 449) 上发现了三处同型单核苷酸置换 (10 872 T→C, 11 001 A→G, 11 346 A→G), 在 *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* 基因片段 (8 011~8 589) 上发现了一处单核苷酸缺失 (8 380 A)。氨基酸序列分析表明, 在 NO 诱导的 EC109 中可能存在着一种结构异常的 ATP-8 肽链 (一条在 N 端被截短的只有 11 个氨基酸残基的肽链, 而正常的 ATP-8 肽链为 68 个氨基酸残基)。这些研究结果为深入揭示 NO 对肿瘤细胞的作用机制提供了新的重要线索。

关键词 食管癌, 一氧化氮, 线粒体 DNA 编码基因, 基因过表达, 抑制消减杂交

学科分类号 Q343.1⁺3

目前, 基因功能方面的研究是生命科学研究领域的重要课题, 其核心内容包括阐明未知基因的功能和鉴定已知基因的新功能两个层面。但无论如何, 与某些疾病或独特的生物学现象相联系, 研究两个或多个来源密切相关的生物系统之间基因表达的差异性, 已成为揭示基因功能的重要环节或有效途径^[1~3]。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是生物体内一种重要的信使分子, 对细胞存在着十分广泛的生物学作用。1998 年以来, 许多研究证明 NO 对肿瘤细胞有诱导性杀伤作用^[4,5]。在 NO 对肿瘤细胞发挥杀伤作用的过程中, 将会出现体现作用本质的一些基因的差异性表达, 而在这些发生差异性表达的基因中间将可能有与杀伤肿瘤细胞密切相关的基因存在。获得这些基因, 无论是对肿瘤的治疗或预防, 还是对肿瘤发病机制的深入探讨都将具有重要意义。本文将人食管癌细胞系 EC109 作为驱赶方 (driver), 而将被 NO 诱导的 EC109 作为实验方 (tester), 应用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 等技术手段首次研究发现 NO 能够诱导食管癌细胞线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 编码的基因过表达。而与此同时, 在这些基因上还发现了多处碱基突

变。这些研究结果为深入揭示 NO 对肿瘤细胞的作用机制提供了新的重要线索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

食管癌细胞系 EC109 由中国医学科学院肿瘤研究所林晨研究员惠赠。细胞培养条件: MEM 培养基, 37℃, 5% CO₂, 10% 的小牛血清。

1.2 抑制消减杂交 (SSH) 实验

以硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 为 NO 供体, 对 EC109 作用的浓度为 400 μmol/L, 作用时间为 8 h。把 EC109 作为驱赶方 (driver), 把 NO 作用的 EC109 作为实验方 (tester), 组成一个 SSH 系统。polyA⁺ RNA 的提取采用 QIAGEN kit, 而 SSH 实验采用 Clontech PCR select cDNA subtraction kit。基本实验步骤如下: a. 分别提取 driver 和 tester 两种细胞的 polyA⁺ mRNA, 反转录

* 广东省自然科学基金资助项目 (990799, 984068) 和广东省医学科学技术研究基金资助项目 (B1999105)。

** 通讯联系人。

Tel: 0754-8532720, E-mail: nmli@21cn.com

收稿日期: 2001-12-14, 接受日期: 2002-01-28

后用 *Rsa* I (GT↓AC) 处理 cDNA. b. 然后把 tester cDNA 均分为两份, 分别接上不同的接头, 再分别与变性的过量 driver cDNA 杂交. c. 杂交后, 将两份样本混合再继续与变性的 driver cDNA 杂交. d. 经巢式 PCR 扩增上述抑制消减处理的 cDNA 片段, 然后将扩增产物克隆至 T 载体, 转化大肠杆菌, 获得 SSH cDNA 文库. e. 通过蓝白斑实验从 SSH cDNA 文库中筛选出可疑重组子. f. 采用特异的限制性内切酶 *Eco*R I 切割, 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外投射仪下照相鉴定 SSH 阳性克隆.

1.3 反向 mRNA 斑点印迹实验

1.3.1 斑点印迹膜的制备: 从 SSH 阳性克隆中随机选取 30 个, 以 PCR 法扩增所插入片段, 浓缩后在尼龙膜上按照 6×5 方式分两个阵列平行点样, 每个点所占尼龙膜的面积为 1 cm×1 cm, 而在每个点的中心位置上点加浓缩的 PCR 产物大约 300 ng (1 μl).

1.3.2 探针标记及印迹显示: driver 和 tester 实验标本 polyA⁺ mRNA 的提取同样采用 QIAGEN kit. 探针标记采用 Amersham Pharmacia Biotech 的 Alkphos direct labelling and detected kit. 杂交液中含有标记的 driver 或 tester 的 polyA⁺ mRNA 大约 300 ng, 同时分别与上述制备的斑点印迹膜杂交过夜. 化学发光法检测, 底片曝光时间选择 60 min, 以底片进行如下的斑点印迹光密度扫描分析.

1.3.3 反向 mRNA 斑点印迹光密度扫描及其数据处理方法: 在 Leica Q550IW 型图象分析仪上, 采用 Leica Qwin 软件包对 tester 和 driver 两个列阵的反向 mRNA 斑点印迹分别进行光密度扫描, 以平均单位面积光密度来计量, 对每一个点均在其邻近选取一个点作为背景对照. 扣除背景后, 计算两个列阵各对应点之间 tester 与 driver 的光密度值的比值 (*R*). 遵照统计学原则, 把过表达基因克隆的判定标准规定为 tester 与 driver 的光密度值的比值大于或等于 2.00.

1.4 过表达基因的 RNA 印迹分析验证

分别提取上述 driver 和 tester 细胞的总 RNA (Trizol reagent, GIBCO 公司), 在甲醛变性凝胶下电泳, 转膜; 以过表达基因 EST 的 PCR 产物 (质粒来源于上述 SSH cDNA 文库) 为探针 (Alkphos direct labelling kit, Pharmacia) 进行杂交, CDP-star 检测 (Pharmacia 公司).

1.5 过表达基因序列的测定及其同源性分析

将插入 pT-Adv 载体中的过表达基因的 EST 片段直接进行测序 (上海基康公司), 然后利用 NCBI 公共数据库进行 BLAST 分析 (同源性比对和突变分析).

2 结 果

2.1 ND-4L/ND-4 基因 SSH 阳性克隆的鉴定

采用特异的限制性内切酶 *Eco*R I 切割, 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 紫外投射仪下照相等方法, 对以 EC109 作为 driver, 以 NO 诱导的 EC109 作为 tester 的 SSH cDNA 文库中的可疑重组子进行鉴定, 共获得了 69 个阳性克隆. 这些克隆的片段大小主要集中在 500~1 000 bp 范围内, 部分结果见图 1. 在 69 个阳性克隆中包含着那些 NO 诱导后在 EC109 中呈现过表达的基因. 对这些基因必须采取进一步的技术手段才能够把它们筛选出来. 图 1 中的 1 号为本文所鉴定出来的 mtDNA 编码基因 ND-4L/ND-4 的一个 *Rsa* I 片段.

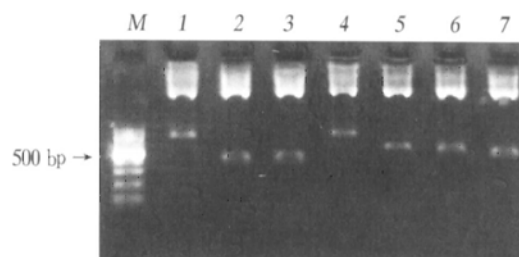


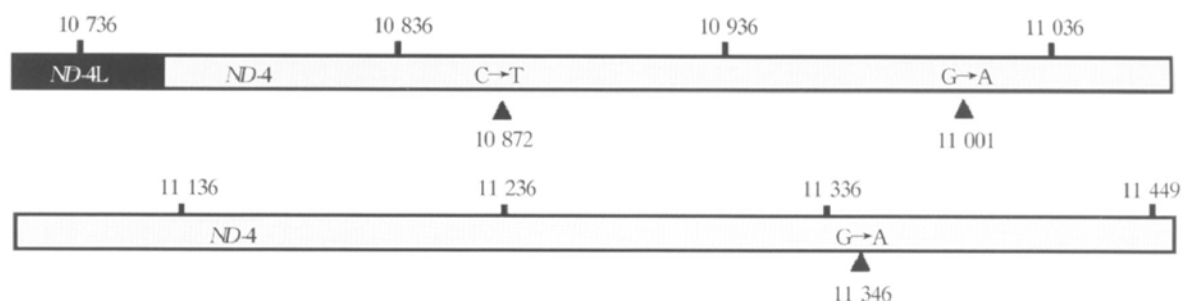
Fig. 1 The electrophoresis analysis of SSH partly positive clones after *Eco*R I digested

M: 100 bp ladder marker; 1: SSH positive clones of the ND-4L/ND-4 gene (a *Rsa* I fragment, 714 bp); 2~7: other SSH positive clones.

人类 mtDNA 上共存在着 13 个编码蛋白质的基因, 其中 12 个由 mtDNA 重链转录, 而另外一个则由 mtDNA 轻链转录. 由 mtDNA 重链转录的 12 个蛋白质编码基因转录后被最终加工成 10 条 mRNA 分子以供线粒体内蛋白质翻译之用. 这其中 ND-4L 和 ND-4 的转录本在同一条 mRNA 分子上, 定位于人类线粒体基因组的 10 469~12 136 (8) 区, 该区存在着 4 个 *Rsa*I 位点. 本文所鉴定出来的 ND-4L/ND-4 基因的 *Rsa*I 片段即位于第一和第二个 *Rsa*I 位点之间 (714 bp, 10 736~11 449). 另外 ND-4L 和 ND-4 基因前后紧密相连, 并在连接处有 7 碱基 (10759-ATGCTAA-10765) 的重叠 (表 1 和图 2).

Table 1 The mRNA reading frames transcribed from mtDNA H-strand^[6]

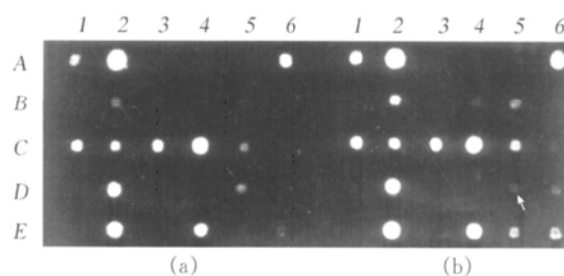
mRNA number	gene name	Location, Length/bp	<i>Rsa</i> I site	Length between two <i>Rsa</i> I site/bp
mRNA 1	<i>ND-1</i>	3 304~ 4 261, 958	3 335~ 3 338	
mRNA 2	<i>ND-2</i>	4 469~ 5 510, 1 042	5 053~ 5 056	
mRNA 3	<i>COX-1</i>	5 891~ 7 443, 1 553	6 998~ 7 001 7 012~ 7 014	17
mRNA 4	<i>COX-2</i>	7 585~ 8 293, 709	7 896~ 7 899 7 911~ 7 914 8 011~ 8 014	19 104
mRNA 5	<i>ATP-8</i> <i>ATP-6</i>	8 364~ 9 205, 842	8 586~ 8 589 8 997~ 9 000	415
mRNA 6	<i>COX-3</i>	9 206~ 9 988, 783	9 745~ 9 748	
mRNA 7	<i>ND-3</i>	10 058~ 10 403, 346		
mRNA 8	<i>ND-4L</i> <i>ND-4</i>	10 469~ 12 136, 1 668	10 736~ 10 739 11 446~ 11 449 11 458~ 11 461 11 546~ 11 549	714 16 92
mRNA 9	<i>ND-5</i>	12 336~ 14 741, 2 406	13 323~ 13 326	
mRNA 10	<i>CYTB</i>	14 746~ 15 880, 1 135	15 810~ 15 813	

**Fig 2** A schematic representation of the sequence of *ND-4L/ND-4* gene *Rsa* I fragment (10 736~ 11 499, 714 bp) from the EC109 cell line induced by NO (nitric oxid)

The dubious mutated nucleotides (10 872 T → C, 11 001 A → G, 11 346 A → G) in the *ND-4L/ND-4* gene from the EC109 cell line induced by NO are denoted by a small black triangle. The seven nucleotides overlap between *ND-4L* and *ND-4* genes is not denoted.

2.2 *ND-4L/ND-4* 基因克隆的筛选

通过反向 mRNA 斑点印迹实验对 *ND-4L/ND-4* 基因 SSH 克隆进行了初步筛选, 结果见图 3. 在电脑程序控制之下, 对 tester 和 driver 两个阵列中 *ND-4L/ND-4* 基因对应的 Dot (D5 点) 的光密度实施定量扫描, 扣除各自背景, 计算获得 *ND-4L/ND-4* 基因在 tester 和 driver 两个阵列中的光密度值的比值 *R* 为 3.50. 这一结果表明, *ND-4L/ND-4* 基因克隆在 NO 诱导的 EC109 中为显著过表达基因克隆.

**Fig 3** Screening of overexpressed *ND-4L/ND-4* mRNA in NO induced EC109 cell line by using reverse mRNA dot blot A~E and 1~6 showed a across and a down of SSH positive clones array, respectively. (a) and (b): tester and driver polyA⁺ mRNA were used as probes, respectively (detail see methods). D5: *ND-4L/ND-4* genes (a *Rsa* I fragment, 714 bp).

2.3 *ND-4L/ND-4* 基因过表达的验证

采用 RNA 印迹技术对 *ND-4L/ND-4* 基因在 NO 诱导的 EC109 中是否过表达进行了进一步验证, 从图 4 可见, 在 NO 诱导的 EC109 中 *ND-4L/ND-4* 基因的 mRNA 被明显地检测出来, 而在作为对照的 EC109 中 *ND-4L/ND-4* 基因的 mRNA 未被检测出来. 这表明 *ND-4L/ND-4* 基因在 NO 诱导的 EC109 中确实是过表达的.

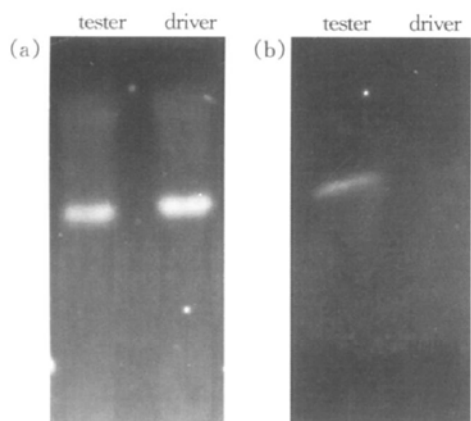


Fig. 4 Identification of overexpressed *ND-4L/ND-4* mRNA in NO induced EC109 cell line by using Northern blot

(a) GAPDH gene (house keeping gene control); (b) The *RsaI* fragment (714 bp) of *ND-4L/ND-4* genes.

2.4 *ND-4L/ND-4* 基因的同源性分析

将插入 pT-Adv 载体中的 *ND-4L/ND-4* 基因的 *Rsa I* 片段 (来源于 SSH cDNA 文库) 分别以 M13 和 T7 为测序引物进行双向测序, 拼接后与 GenBank 进行 BLAST 分析. 从图 2 中可见, 来源于 NO 诱导的 EC109 中 *ND-4L/ND-4* 基因的 *Rsa I* 片段全长为 714 bp, 位于人类 mtDNA 的 10 736~11 449 区, 包括了 30 bp 的 *ND-4L* 基因 3' 端序列和 691 bp 的 *ND-4* 基因 5' 端序列, 与来源于人类胎盘的相应序列 (NC-001807)^[6] 的相似性为 99.6% (711/714). 进一步分析发现, 在来源于 NO 诱导的 EC109 中 *ND-4L/ND-4* 基因的 *Rsa I* 片段上存在着 3 处可疑点突变 (10 872 T → C, 11 001 A → G, 11 346 A → G). 但氨基酸序列分析表明, 上述 3 处可疑点突变并未引起相应氨基酸残基的替换. 这提示, 在 NO 诱导的 EC109 中, *ND-4L* 和 *ND-4* 基因可能依然保持着它们各自原来的蛋白质编码功能不变.

2.5 *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* 基因的筛选

依据 mtDNA 基因组织结构特点 (一条链上的基因共用同一个启动子) 以及 mtDNA 上 *Rsa I* 位

点的分布情况 (表 1), 我们推测在本文的 SSH 阳性克隆库中除了 *ND-4L* 和 *ND-4* 外, 可能还存在着 mtDNA 编码的 *ATP-6* 等其他基因的 *Rsa I* 片段. 为了证明这一点, 有必要把大小为 450~650 bp 的片段 (*ATP-6* 基因上最长的 *Rsa I* 片段的长度为 415 bp, 再加上 SSH 接头等边界序列) 从 69 个 SSH 阳性克隆中挑选出来, 以备测序鉴定. 结果共获得了 16 个可疑克隆, 部分结果见图 5. 图 5 中 219 和 114 号为本文所鉴定出来的 mtDNA 编码 *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* 基因的一个 *Rsa I* 片段 (8 011~8 589, 589 bp) 的重复克隆.

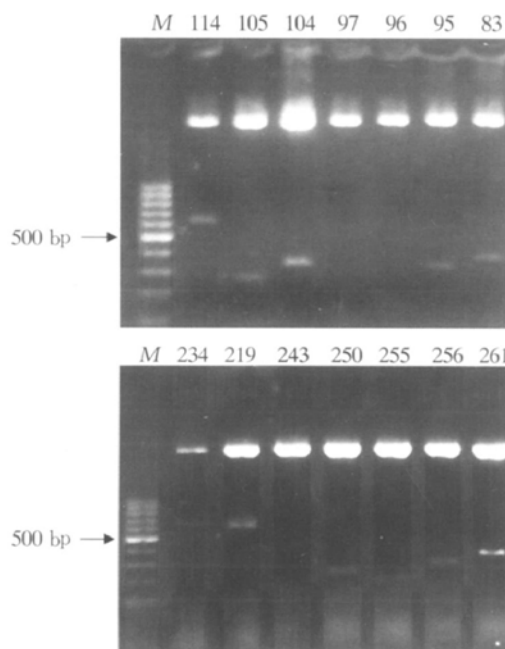


Fig. 5 The electrophoresis analysis of partly 450~650 bp ESTs in SSH positive clones after *EcoRI* digested

M: 100 bp ladder marker. The numbers in figure are the numbers of SSH positive clones. The 114 th and 219 th are two same clones for *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* genes which is identified after sequence analyzing.

2.6 *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* 同源性分析

将上述可疑克隆分别以 M13 和 T7 为测序引物进行双向测序, 拼接后与 GenBank 进行 BLAST 分析. 从图 6 可见, 来源于 NO 诱导的 EC109 中 *COX-2/Lys-tRNA/ATP-8/ATP-6* 基因 *Rsa I* 片段的全长为 589 bp, 位于人类 mtDNA 的 8 011~8 589 区, 包括 258 bp 的 *COX-2* 基因的 3' 端序列、*Lys-tRNA* (70 bp) 和 *ATP-8* (206 bp) 基因的全序列以及 46 bp 的 *ATP-6* 基因的 5' 端序列, 与来

源于人类胎盘的相应序列 (NC-001807)^[6] 的相似性为 99.8% (588/589)。进一步分析发现在这个 *Rsa* I 片段上 *Lys*-tRNA 和 *ATP*-8 基因的剪切点附近存在着一处单核苷酸缺失 (8 380 A)，结果将导致移码突变。氨基酸序列分析表明，此突变将可能导致在 NO 诱导的 EC109 中产生一种结构异常的

ATP-8 肽链，一条在 N 端被截短的只有 11 个氨基酸残基的肽链 (正常的 *ATP*-8 肽链为 68 个氨基酸残基)，而且此肽链 C 端的 6 个氨基酸残基与正常的 *ATP*-8 肽链相应位置的氨基酸残基不匹配。有关结果见图 7。

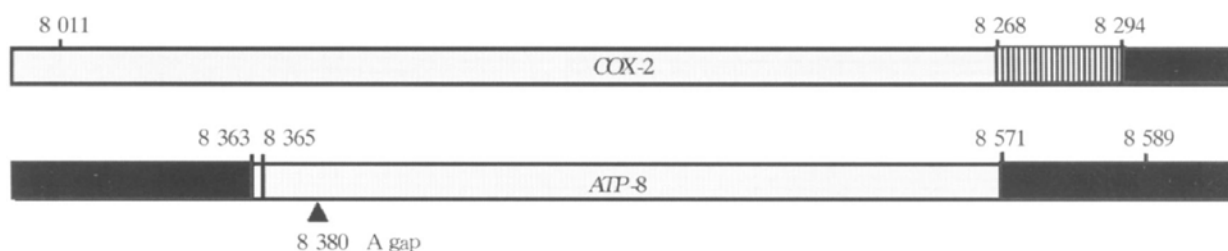


Fig. 6 A schematic representation of the sequence of *COX*-2/*Lys*-tRNA/*ATP*-8/*ATP*-6 genes *Rsa* I fragment (8 011~ 8 589, 579 bp) from the EC109 cell line induced by NO

The single nucleotide deletion (8 380, A) in the *ATP*-8 gene from the EC109 cell line induced by NO are denoted by a small black triangle. The 46 nucleotides overlap between *ATP*-8 and *ATP*-6 genes is not denoted. The spacing region between *COX*-2 and *Lys*-tRNA (8 269~ 8 293) is denoted by vertical stripes.

1 M P Q L N L P Y G P P
 2 ATG CCC CAA CTA AAT CTA CCG TAT GGC CCA CCA TAA
 3 ATG CCC CAA CTA AAT ACT ACC GTA TGG CCC ACC ATA ATT.....
 4 M P Q L N T T V W P T M I.....

Fig. 7 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ATP*-8 gene 5' encoding region from the EC109 cell line induced by NO

1: It is shown that deduced amino acid sequence of *ATP*-8 gene 5' encoding region from the EC109 cell line induced by NO; that in box are mutated amino acid residues; 2: It is shown that nucleotide sequence of *ATP*-8 gene 5' encoding region from the EC109 cell line induced by NO; the blacked TAA is stopping codon. 3, 4: They are shown that nucleotide and deduced amino acid sequence of *ATP*-8 gene 5' encoding region from GenBank (NC-001807), respectively; the downlined A is a deleted nucleotide in the EC109 cell line induced by NO.

3 讨 论

人类 mtDNA 是人类基因组的重要组成部分，含 16 569 个碱基对，为一条双链环状的 DNA 分子。双链中一条为重链，另一条为轻链，这是根据它们的转录产物在 CsCl 中密度的不同而区分的。人类 mtDNA 上共存在着 37 个基因，分别为 2 个 rRNA 分子、22 个 tRNA 分子和 13 个蛋白质多肽分子编码。这是人类线粒体遗传系统半自主性的物质基础。序列分析表明，人类 mtDNA 与人类核 DNA 在基因组组织上有明显差别。人类 mtDNA 的一个显著特点是同一条链上的基因，包括 tRNA 基因、rRNA 基因和蛋白质编码基因均由同一个启动子启动转录。这意味着人类 mtDNA 同一条链上的各基因将有一个共同的较大的转录本前体。另外，

人类 mtDNA 蛋白质编码基因的绝大多数 (12/13) 是由 mtDNA 的重链转录的，它们与一些线粒体 tRNA 基因紧密相间排列。在转录后加工中，各 mRNA 分子的成熟化与各 tRNA 分子的自剪切是偶联在一起的^[6]。这种一致性转录后加工机制和共同的转录本前体将可能使线粒体中各 mRNA 分子的含量保持在同一水平。并且这些 mRNA 分子可能会在转录以及转录后加工层面上随着某一基因表达调控因素的改变而统一地出现上调或下调。因此我们认为在 NO 诱导的 EC109 中除了 *ND*-4L 和 *ND*-4 基因过表达外，可能还存在着由 mtDNA 重链转录的其他蛋白质编码基因的过表达。实际上，在 NO 诱导的 EC109 中真正的实质性表现可能是整条 mtDNA 重链，甚至同时包括整条 mtDNA 轻链在内的所有 mtDNA 编码基因的转录增强。然而为什么会有这种表现，其生物学意义是什么？这些问题值得深入探讨。依据 mtDNA 基因上 *Rsa* I 位点的分布情况 (表 1)，我们推测在本文的 SSH 阳性克隆库中除了 *ND*-4L/*ND*-4 而外，可能还存在着 mtDNA 编码的 *ATP*-6 基因上的一个 *Rsa* I 片段 (415 bp)。然而令人费解的是，在随后的验证性实验中，从 SSH 阳性克隆库中却意外地发现了一条 589 bp 的 *COX*-2/*Lys*-tRNA/*ATP*-8/*ATP*-6 基因上的 *Rsa* I 片段的克隆。在正常情况下，线粒体中 *COX*-2、*Lys*-tRNA 和 *ATP*-8/*ATP*-6 等基因的成熟转录本并非连在一起，而是被剪切分开成三个不同的 RNA 分子。因此，本文的上述结果至少提

示, 在 NO 诱导的 EC109 中 *COX-2* 与 *Lys-tRNA*, 以及 *Lys-tRNA* 与 *ATP-8/ATP-6* 等基因之间的转录后剪切加工可能被抑制了. 至于是什么原因抑制了 *COX-2* 与 *Lys-tRNA*, 以及 *Lys-tRNA* 与 *ATP-8/ATP-6* 等基因之间的转录后剪切加工, 这是否与 NO 对细胞的作用直接相关等问题目前还不清楚. 通常, 成熟 RNA 前体分子剪切点部位的不正常甲基化是应该被首先考虑的因素, 但这依赖于在 NO 诱导的 EC109 细胞线粒体中存在着相应的特异性甲基化酶. 另外在 *Lys-tRNA* 与 *ATP-8/ATP-6* 基因之间剪切点附近的核苷酸缺失突变 (8 380, A) 是否与上述的基因转录后剪切抑制有关也值得重视. 然而无论如何, 这一改变的直接后果都将导致成熟的 *Lys-tRNA* 的生成障碍, 因此有可能对线粒体中蛋白质的合成产生负面影响. 另外, 因为 8 380 位点核苷酸 (A) 的缺失可导致 *ATP-8* 基因读框产生一种移码突变 (图 7), 因此在 NO 诱导的 EC109 细胞线粒体中可能存在着一种结构异常的 *ATP-8* 肽链. 由于 *ATP-8* 是线粒体内膜 ATP 合成酶复合物中组成 F₀ 因子 (质子通道) 的一个亚基, 所以上述突变可能破坏了线粒体内膜上与 ATP 合成有关的质子传递通道的有效组装, 因此线粒体内膜上 ATP 的合成可能也要受到影响.

近年来, 对线粒体基因组的研究又重新引起了人们的兴趣, 而且所涉及的范围十分广泛并取得了一些进展, 比如研究发现植物的胞质雄性不育、一些真核细胞的抗药性以及细胞的生命周期等可能与 mtDNA 有关^[7]. 另外, 人们在线粒体的研究中还发现了诸如呼吸链的电子漏、氧化磷酸化的解偶联、活性氧的信号传递、线粒体内膜通透性通道的形成、Box-介导的细胞色素 c 向胞质的转移以及线粒体跨膜电位改变与细胞凋亡相关等许多新的十分有趣的生物学现象^[8~12]. 然而线粒体是十分复杂的, 尚存在着许多未解决的问题, 比如由它自己的 DNA 所编码的一些蛋白质, 包括本文所鉴定出来的 *ND-4L* 和 *ND-4* 的确切功能是什么就至今不明. 这一切似乎都预示着, 对线粒体来讲, 除了为细胞生产提供 ATP 这一主要功能而外, 可能还具有其他潜在的功能尚未被人们所认识. 基于此, 最近有人提出线粒体可能是一个重要的细胞代谢调控中心^[13], 通常情况下它与其他的一些细胞代谢调控点密切联系在一起共同组成了一个细胞代谢调控网络, 在穿梭于核与线粒体等细胞亚结构之间的一些信息分子的帮助下完成对细胞代谢的整体调控.

NO 是一种具有广泛功能的信息分子, 同时又是一种活性自由基物质. 本文的研究结果提示, NO 对细胞的作用机制可能与调控 mtDNA 编码基因的过表达有关. 另外由于 NO 的作用靶广泛分布于包括细胞核与线粒体在内的整个细胞空间, 据此我们推测 NO 可能是一种在线粒体与核或其他细胞亚结构之间传递信息的细胞调控因子.

致谢 在本文撰写过程中曾得到中国科学院生物物理研究所徐建兴教授的指导, 特此致谢. 另外, 感谢中国医学科学院肿瘤研究所林晨研究员为本文无偿提供食管癌细胞系 EC109.

参 考 文 献

- 1 Zuber J, Tchernitsa O I, Hinzmann B, *et al.* A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet*, 2000, **24** (2): 144~155
- 2 Sandu H, Dehnen W, Roller M, *et al.* mRNA expression patterns in different stages of asbestos-induced carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (1): 123~129
- 3 许丽艳, 李恩民, 熊华洪, 等. NGAL 基因在永生食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (6): 839~843
XU Li-Yan, LI En-Min, XIONG Hua-Qi, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 839~843
- 4 Broukhaus F, Brune B. U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. *Exp Cell Res*, 1998, **238** (1): 33~41
- 5 Gupta S, Ahmad N, Mukhtar H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res*, 1998, **58** (9): 1785~1788
- 6 Anderson S, Bankier A, Barrell B, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, **290** (5806): 457~465
- 7 廖顺尧, 鲁成. 动物线粒体基因组研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (5): 508~512
LIAO Shun-Yao, LU Cheng. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (5): 508~512
- 8 Skulachev V P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998, **423** (2): 275~280
- 9 Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, *et al.* Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26** (3/4): 396~409
- 10 Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondria control of apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5385): 2027~2031
- 11 Finucane D M, Wetzel E B, Waterhouse N J, *et al.* Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2225~2233
- 12 蔡循, 陈国强, 陈竺, 等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (1): 3~6
CAI Xun, CHEN Guo-Qiang, CHEN Zhu *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (1): 3~6
- 13 赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (2): 167~171
ZHAO Yun-Gang, XU Jian-Xing. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (2): 167~171

Overexpression of Mitochondria DNA Encoded Genes in Human Esophageal Carcinoma Cell Line Induced by Nitric Oxide*

LI En-Min^{**}, XU Li-Yan²⁾, Yang-Fan¹⁾, YUAN Lan³⁾, CHEN Yue³⁾

(¹⁾ Biochemistry and Molecular Biology Department, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China;

²⁾ Institute of Oncologic Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China;

³⁾ Analytical Center of Medicine and Hygiene, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract Overexpression of the genes induced by nitric oxide (NO) in EC109 esophageal carcinoma cell line was studied by using suppression subtractive hybridization (SSH), reverse mRNA dot blot and Northern blot. The nucleotide of their expressed sequence tag (EST) was sequenced and analyzed by NCBI database. The six mitochondrial DNA coding genes, *ND-4L*, *ND-4*, *COX-2*, *Lys-tRNA*, *ATP-8* and *ATP-6* were identified from 69 SSH positive clones. The results indicated that NO can distinctly induce overexpression of mitochondria DNA encoded genes in the esophageal carcinoma cells. In addition, it was discovered that there were single nucleotide substitution in three sites of the fragment of *ND-4L* and *ND-4* genes (10 736~ 11 449, 10 872 T → C, 11 001 A → G, 11 346 A → G), and one single nucleotide deletion (8 380, A) which will lead to occur the frame-shift mutation in the peptide in the fragment of *COX-2*/*Lys-tRNA* / *ATP-8*/*ATP-6* genes (8 011~ 8 589). The analysis of amino acid sequences showed that an incorrect structural ATP-8 subunit existed possibly in the EC109 cell induced by NO. These results provided a new clue for further exploring the mechanism of NO effecting on carcinoma cells.

Key words esophageal carcinoma, mitochondrial DNA coding genes, overexpression, nitric oxide, suppression subtractive hybridization

* This work was supported by grants from Guangdong Provincial Natural Science Foundation of China (990799, 984068) and Guangdong Provincial Medical Science and Technique Foundation of China (B1999105).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8532720, E-mail: nmli@21cn.com

Received: December 14, 2001 Accepted: January 28, 2002