胃癌组织 mtDNA 突变与癌变关系的探讨

柳满然 吕有勇*

(北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034. *联系人, E-mail: yonglyu@public.bta.net.cn)

摘要 为了进一步明确 mtDNA 突变与胃癌发生、发展的关系, 利用变性高效液相色谱(DHPLC)和 DNA 测序技术, 对 30 例胃癌组织和对应的正常组织 mtDNA 基因组全序列进行了筛查. 研究结果确定胃癌中 mtDNA 存在高频率的突变, 突变频率为 66.7%(20/30), 其中 56.7%(17/30)的突变仅见于癌组织. 突变频率较高的基因为 *ND4*, *ND5* 和 *D-loop*, 分别为 36.7%, 26.7%和 30%. 与组成电子传递链复合体Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ的基因相比, 复合体Ⅰ基因在被检测的癌组织 mtDNA 中的突变率最高(43.3%). 突变类型以碱基替代为主(85.4%). 研究结果提示, 复合体Ⅰ基因, 特别是 *ND4*, *ND5* 和 *ND3* 基因突变在胃癌的发生、发展中起重要作用.

关键词 胃癌 mtDNA 基因突变 DHPLC 胃癌发生

胃癌的发生发展是一个多因素、多阶段和多基因变异的复杂演变过程, 胃癌组织和胃癌细胞系中有数十种基因的变异(点突变、扩增、缺失和表达异常). 我们以往的研究已确定肠型胃癌和癌前病变组织存在 *c-met*, *ras*, *erbB2* 和 *EGFR* 等癌基因和 *p53*, *APC*, *p16* 和 *nm23* 等抑癌基因的突变或表达异常^[1], 日本学者报道 *p53* 基因点突变, *APC* 和 *DCC* 基因杂合缺失与肠型胃癌的发生关系密切^[2]. 新西兰学者证实 E-钙调蛋白基因是弥漫型胃癌发生的易感基因^[3]. 最近应用基因芯片技术, 在胃癌组织中检出一百多个基因表达上调^[4]. 同时, 人们已关注到线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)突变与肿瘤发生发展有关, 并认为可能是引发肿瘤的一种始动因素^[5,6].

人类 mtDNA 是约 16.5 kb 的闭环双链分子, 编码与氧化磷酸化相关的有 13 种多肽, 2 种 rRNA 及 22 种 tRNA. 由于 mtDNA 缺乏组蛋白的保护和有效的 DNA 损伤修复体系, 并长期暴露于活性氧(reactive oxygen species, ROS)环境中, 使得 mtDNA 比核 DNA 更易受损. 近年来, 人们在肺癌、肝癌、直肠癌等多种恶性肿瘤中检测到线粒体基因组的不稳定性、突变或基因表达异常^[7~9].

胃癌 mtDNA 调控区 *D-loop* 和 *ND5*, *ND2* 基因也存在 mtDNA 不稳定或点突变^[10,11], 但这些研究反应的是胃癌 mtDNA 部分片段的变化, 对整个 mtDNA 基因组的突变状况还缺乏全面的了解. 为了进一步阐明胃癌和癌前病变组织中 mtDNA 的突变及突变累

积在胃癌发生、发展中的作用和生物学意义, 我们采用变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)这一高通量和高灵敏的基因突变检测技术^[12,13], 对 30 例胃癌组织及对应的正常胃黏膜组织的 mtDNA 全序列进行了筛查, 进一步明确了胃癌中 mtDNA 的突变频率、分布和类型, 并探讨了 mtDNA 突变与胃癌发生发展的关系.

1 材料与方法

(i) 胃癌组织标本及 DNA 的提取. 30 例病理诊断明确的胃癌组织标本(病人年龄 38 ~ 76 岁)来自北京肿瘤医院, 包括 20 例肠型胃癌和 10 例弥漫型胃癌及癌组织对应的正常组织. 组织细胞基因组 DNA 的提取按标准的酚/氯仿法操作^[14].

(ii) PCR 反应. 用于研究的 44 对 PCR 引物覆盖 mtDNA 全序列, 序列设计按文献[15]. PCR 扩增主要包括单对引物 PCR 和巢式 PCR. (1) 单对引物 PCR 条件: 15 ng 基因组 DNA, 上下游引物 125 nmol/L, Mg²⁺浓度 1.6 mmol/L, dNTP 各为 37.5 μmol/L, 1.2 U 的 Pfu DNA 聚合酶, 加双蒸水至 20 μL. 在 Biometra PCR 仪上进行扩增反应, 95℃预变性 2 min, 紧接着 94℃变性 30 s, 58 ~ 65℃退火 45 s, 72℃延伸 80 s, 共 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min. 为了排除核 DNA 中假基因的干扰, DHPLC 初筛得到的全部阳性片段, 经巢式 PCR 扩增后 DHPLC 再证实. (2) 巢式 PCR 扩增分两步完成. (a) 将上述 44 对引物经重新组

合选取 7 对引物, 对 mtDNA 基因组进行扩增得到 7 个 2.4 ~ 3.5 kb 的大片段. 与(1)相比 PCR 反应体系和条件修改如下: dNTP 各 50 μ mol/L, Taq 聚合酶 1.5 U, 退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 延伸 150 s. (b) 以这些大片段为模板, 利用相应的单对引物分别扩增初筛得到的各样本中的阳性片段, 反应条件同前.

(iii) DHPLC 分析. PCR 产物在 PCR 仪经 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 以 1 $^{\circ}$ C/min 的速度缓慢降至 45 $^{\circ}$ C, 形成异源双链和同源双链 DNA 分子混合物. 输入被检片段的 DNA 序列, 应用 Wavemaker 4.0 软件预测 DHPLC 分析的检测温度和缓冲液梯度, 在预测温度 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 的范围内, 获得该片段的最佳检测温度. 流动相是含 0.1 mmol/L 三乙胺乙酸盐(TAEE)的乙腈缓冲液(pH 7.0), 流速为 0.9 mL/min. 所有异常改变的样本经 DHPLC 重复分析 2 ~ 3 次.

(iv) DNA 测序. 具有异常 DHPLC 峰型的癌组织和对应的正常组织 mtDNA PCR 扩增产物, 经 4% 的聚丙烯酰胺凝胶^[14]纯化后, 进行 DNA 测序. 测序反应用 ABI PRISM[®] BigDye[™] 循环测序反应试剂盒 (ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 在 ABI Prism377 测序仪上进行,

方法同试剂盒的说明书. 测序反应所用的引物同 PCR 反应的引物. DNA 序列经核苷酸序列同源性分析(BLAST), 并与 Cambridge 标准 mtDNA 序列进行对比.

(v) 统计分析. 用 SAS 统计分析软件包进行有关的统计分析. 差异的显著性分析采用 χ^2 检验. 当 $P < 0.05$ 时, 各组数据的差异具有显著性.

2 结果

2.1 胃癌组织 mtDNA 基因组的突变频率

应用 DHPLC 技术, 对 mtDNA 基因组全长序列进行了突变筛查. 在 30 例胃癌组织中检出 20 个病例存在 mtDNA 异常(66.7%), 其中 17 个病例在癌组织中检出突变(56.7%), 3 例样本癌与正常组织都检出突变(10%). 肠型和弥漫型胃癌组织 mtDNA 突变频率各为 70%(14/20)和 60%(6/10), 未见明显差异($P > 0.05$).

2.2 胃癌 mtDNA 突变的分布

被检测的胃癌组织线粒体各基因突变频率存在差异. 线粒体基因 *ND4*, *ND5* 和 *D-loop* 调控区的突变

表 1 30 例胃癌组织线粒体基因及 *D-loop* 区突变率

基因	长度/bp	异常检出率/%				千碱基受损位点	
		癌组织		正常组织		基因	基因簇*
<i>D-loop</i>	1122	30 ^{a)}	9 ^{b)}	3.3 ^{a)}	1 ^{b)}	15.2	15.2
<i>12S</i>	954	16.7	5	0	0	5.2	2.8
<i>16S</i>	1559	10	3	3.3	1	1.3	
<i>ND1</i>	958	13.3	4	0	0	4.2	7.6
<i>ND2</i>	1041	13.3	4	3.3	1	5.8	
<i>ND3</i>	346	16.7	5	6.7	2	8.7	
<i>ND4L</i>	297	3.3	1	3.3	1	3.4	
<i>ND4</i>	1378	36.7	11	6.7	2	10.9	
<i>ND5</i>	1812	26.7	8	3.3	1	8.3	
<i>ND6</i>	522	16.7	5	3.3	1	7.7	
<i>CO I</i>	1544	10	3	3.3	1	1.3	2.3
<i>CO II</i>	709	6.7	2	0	0	2.8	
<i>CO III</i>	785	13.3	4	0	0	3.8	
<i>ATPase8</i>	207	10	3	3.3	1	9.7	3.4
<i>ATPase6</i>	681	6.7	2	3.3	1	1.5	
<i>Cyt b</i>	1141	16.7	5	0	0	4.4	4.4

a) 检出率, b) 检出异常样本数. * 是指功能相似的几个基因, 包括 *D-loop*, *rRNAs*, 复合体 I, III, IV 和 V 中线粒体基因

频率较高, *CO II*, *ATPase6* 和 *ND4L* 基因突变率较低(表 1). 此外, 在 13 个胃癌细胞系中, 也检测得到 *ND4*, *ND5* 和 *D-loop* 有高频突变(资料另文报道).

研究发现, 胃癌组织 mtDNA 突变在电子传递链复合体亚单位基因及 *D-loop* 区存在差异. 组成电子传递链复合体 I, III, IV 和 V 基因, rRNA 基因及 *D-loop* 突变率分别为 43.3%, 16.7%, 16.7%, 10%, 23.3% 和 26.7%, *D-loop* 和组成复合体 I 的基因突变频率较高. 因各基因序列长度不一, 为了进一步说明各基因突变情况, 以每千个碱基所含有的突变位点数评价其受损程度, 结果列入表 1. *D-loop* 区每千个碱基约有 15.2 个突变位点, *ND4*, *ATPase8*, *ND3* 和 *ND5* 分别含 10.9, 9.7, 8.7 和 8.3 个, *16S*, *CO I*, *ATPase6*, *CO II*, *ND4L* 和 *CO III* 各为 1.3, 1.3, 1.5, 2.8, 3.4 和 3.8 个受损位点. 癌组织 mtDNA 每千个碱基含有的突变位点数复合体 I 最高, 与其他复合体基因相比具有差异($P < 0.05$).

2.3 胃癌组织中线粒体基因的突变类型

在 20 例存在 mtDNA 突变的癌组织中, 其中 19 例样本(95%)见于 *ND4*, *ND5* 和 *D-loop* 调控区. 将 *ND4*, *ND5* 和 *D-loop* 区检出有突变的癌组织及对应的正常组织 PCR 片段进行测序分析, 共鉴定出 47 个突变位点, 有代表性的 DHPLC 峰型图谱、成对的癌和正常组织片段的测序结果见图 1. 经过与 mtDNA 数据库(<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>) mtDNA 突变资料对比, 发现 17 个突变位点在癌和线粒体疾病中未见报道(表 2).

在这些突变位点中有 13 个位点发生了氨基酸改变, 9 个位点为同义突变. 25 个位于 *D-loop* 区的变化位点, 绝大多数在其他线粒体疾病中已有报道, 属于人群中的多态性变化. mtDNA 突变类型主要为碱基替代(85.4%, 41/48), 其中碱基转换和颠换各占 66.7%(32/48)和 18.8%(9/48). G → A, T → C 转换和 G → T, A → C 颠换占 43.8%(21/48), 提示 mtDNA 突变与活性氧有关.

此外, 本研究中 4 个病例 GC16, GC17, GC35 和 GC37 存在多个突变位点, 分别检出 21, 19, 20 和 19 个突变位点, 这一结果提示 mtDNA 损伤可能具有突变累积性.

图 1 DHPLC 检出的 mtDNA 阳性样本的异源双链峰及对应的序列测定结果
(a) 癌和正常组织都检出的 mtDNA 变化, DHPLC 峰型相同, 经测序分析证实同一位点发生 A→G 替代. (b) 癌组织 mtDNA 突变, 癌组织 (T) 与正常组织 (N) DHPLC 峰型不同; 测序分析发现肿瘤组织存在碱基突变(如箭头所示: I 示 A→G, II 示 C→T, III 示 C→T), 对应的正常组织未见碱基变化

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-14-1083>

表 2 胃癌组织 mtDNA 的主要突变区和突变类型

样本	核苷酸位点	基因	碱基改变	氨基酸改变
(1) 导致氨基酸改变的 <i>ND4</i> 和 <i>ND5</i> 基因突变				
GC13,16,35,37	10761*	<i>ND4L</i>	T→G	C→G
GC13,16,35,37	10761*	<i>ND4</i>	T→G	M→R
GC16, 41	11016*	<i>ND4</i>	G→A	S→N
GC13,35, 37	11017*	<i>ND4</i>	T→G	S→R
GC2, 13	11249*	<i>ND4</i>	C→G	L→V
GC2, 13	11477*	<i>ND4</i>	G→A	G→S
GC5	11867~11872*	<i>ND4</i>	Ins CCC	
GC39	11955*	<i>ND4</i>	A→C	N→T
GC16	12406	<i>ND4</i>	G→A	V→I
GC9	12584	<i>ND5</i>	A→G	D→G
GC18	12640*	<i>ND5</i>	G→A	E→K
GC16, 17	13327	<i>ND5</i>	A→C	T→P
GC35,37	13708	<i>ND5</i>	G→A	A→T
(2) 不导致氨基酸改变的 <i>ND4</i> 和 <i>ND5</i> 基因突变				
GC13,35	10873	<i>ND4</i>	T→C	P→P
GC42	11323*	<i>ND4</i>	C→T	N→N
GC42	11410	<i>ND4</i>	T→C	H→H
GC5	11719	<i>ND4</i>	G→A	G→G
GC5, 7	11914	<i>ND4</i>	G→A	T→T
GC17	12672*	<i>ND5</i>	A→G	P→P
GC18	12705	<i>ND5</i>	C→T	I→I
GC18	13509*	<i>ND5</i>	C→T	S→S
GC16, 35, 37	13563	<i>ND5</i>	A→G	L→L
(3) <i>D-loop</i> 区核苷酸变化				
GC17	57*	<i>D-loop</i>	G→A	
GC35,37	61*	<i>D-loop</i>	C→T	
GC35,37	62*	<i>D-loop</i>	G→T	
GC35	64	<i>D-loop</i>	C→T	
GC16, 17	151	<i>D-loop</i>	T→C	
GC17	203	<i>D-loop</i>	G→A	
GC16, 17	251*	<i>D-loop</i>	Ins A	
GC16, 17	303~309	<i>D-loop</i>	(C)7→(C)8	
GC28	303~309	<i>D-loop</i>	(C)7→(C)4	
GC35	523~524	<i>D-loop</i>	del AC	
GC7,17	16129	<i>D-loop</i>	G→A	
GC59	16148	<i>D-loop</i>	C→T	
GC16	16172	<i>D-loop</i>	T→C	
GC35, 37	16174	<i>D-loop</i>	C→T	
GC16	16183	<i>D-loop</i>	A→C	
GC16	16189	<i>D-loop</i>	T→C	
GC7	16193*	<i>D-loop</i>	del C	
GC7	16194	<i>D-loop</i>	Ins C	
GC16	16223	<i>D-loop</i>	C→T	
GC35, 37	16227	<i>D-loop</i>	G→A	
GC17	16239	<i>D-loop</i>	C→T	
GC16	16245	<i>D-loop</i>	C→G	
GC17	16249	<i>D-loop</i>	T→C	
GC35, 37	16278	<i>D-loop</i>	C→T	
GC16	16284	<i>D-loop</i>	A→G	
GC35, 37	16306	<i>D-loop</i>	C→T	

* 本文新报道的突变

3 讨论

本文报道应用 DHPLC 突变检测技术对胃癌组织 mtDNA 进行了全序列筛查, 56.7%(17/30)的样本癌组织存在线粒体基因组突变, 与用直接测序得到的膀胱癌(64%, 9/14)、头颈部癌(46%, 6/13)、肺癌(43%, 6/14)及乳腺癌(61%, 11/18) mtDNA 全序列突变率相似^[16,17].

以往研究表明胃癌 mtDNA 存在不同频率的突变或不稳定性. Tamura^[10]和 Alonso 等人^[18]分别检出 *D-loop* 区点突变为 37.5%(3/8)和 4.4%(2/45). Habano 等人^[11]发现 16.1%(10/62)的癌组织 mtDNA 存在不稳定性, 8.1%(5/62)癌组织 *ND5* 等基因存在突变. 最近 Maximo 等人^[19]检出 *D-loop* 区和 *ND1*, *ND5* 等基因高频点突变(44%, 14/32), 本结果与其报道较吻合. 其他研究由于只检测了部分 mtDNA 序列, 癌组织 mtRNA 突变率低于本研究.

我们的结果进一步支持某些肿瘤 mtDNA 可能存在突变热点^[17]. 胃癌组织中突变频率较高的区域集中在 *NADH* 脱氢酶基因和 *D-loop* 区, *ND4*, *ND5* 及 *D-loop* 较 *16S*, *ATPase6*, *CO I* 及 *CO II* 更易受损(表 1), 胃癌细胞系中也存在相似的现象(资料另文报道). 其他研究者在直肠癌、膀胱癌等肿瘤中也发现 mtDNA 的某些区域容易发生突变或不稳定性^[11,17,19,20]. 是否所有肿瘤中 mtDNA 突变存在明显的突变热点, 尚待证实.

胃癌 *NADH* 脱氢酶基因的高频率突变提示线粒体电子传递链复合体 I 功能异常可能参与了胃黏膜细胞的癌变过程. 文献报道 mtDNA 突变, 特别是呼吸链复合体 I 基因异常是 ROS 异常增加的原因之一. ROS 中的超氧阴离子和羟自由基的产生, 是由于呼吸链复合体 I 和/或 III 功能异常, 电子在半醌或半黄酮位点漏出导致电子传递给分子氧或氧原子所致^[21]. 以往研究结果还证实, mtDNA 突变、电子传递链功能异常和细胞内 ROS 水平的增高具有相互协同、彼此促进的作用, 进一步损伤 mtDNA, 还可能加重核内基因的不稳定性并累及核内癌基因和抑癌基因^[22].

多数学者认为肿瘤 mtDNA 突变是同质性的, 但被检样本癌细胞含量对检测结果产生影响. 细胞系或经显微切割获得的癌组织, 检出同质性突变比率高^[17,20,23], 直接以癌组织(含癌细胞和其他正常细胞)

为研究对象, 检出异质性突变比例较高^[7,11,24,25]. 我们以癌组织为研究对象, DHPLC 检出胃癌 mtDNA 高频率的异质性突变, 本质上可能包括同质性和异质性两种突变类型. 癌细胞中 mtDNA 同质性突变与其他正常细胞中非突变 mtDNA(经检测对应的正常组织被证实)共存, 从而以异质性突变形式被 DHPLC 灵敏检出. 胃癌细胞系 mtDNA 本身异质性突变片段极少(3.3%, 5/153), 据此我们倾向于认为胃癌 mtDNA 突变仍以同质性为主.

此外, DHPLC 检出 3 个病例(GC2, GC17 和 GC32)癌和正常组织 mtDNA 异常. 其他学者在乳腺癌、肝癌和甲状腺肿瘤中也有报道^[7,23,25]. 原因可能在于: (1) 多态现象. 如 GC17 在 *D-loop* 检出多态性变化. (2) 正常组织中的一部分 mtDNA 已存在异常^[16]. (3) 正常组织中含有肠化等癌前病变组织(GC32), 这些肠化组织可能存在 mtDNA 异常. (4) mtDNA 异质性影响. 因此, 胃癌组织 mtDNA 同质性突变比例, 癌前病变组织是否存在 mtDNA 突变, 我们将在胃癌 mtDNA 突变累积研究中用显微切割技术进行证实.

总之, 本研究进一步确定了胃癌组织存在高频率的 mtDNA 突变, 特别是 *ND4*, *ND5* 和 *ND3* 等基因存在高频率的点突变, 为进一步阐明 mtDNA 突变与胃癌的发生、发展的关系提供了重要线索.

致谢 潘凯枫副研究员在 DHPLC 分析中给予大力帮助, 中国医学科学院肿瘤研究所程书钧院士提供了研究所需要的全部 PCR 引物, 在此一并致谢. 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1998051203)和国家杰出青年基金(批准号: 3962526)资助项目.

参 考 文 献

- 1 吕有勇. 多基因变异的累积与肿瘤发生发展的关系. 中华医学杂志, 1997, 77: 877 ~ 880
- 2 Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers: the application to molecular diagnosis. Cancer, 1995, 75: 1410 ~ 1417
- 3 Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature, 1998, 392: 402 ~ 405
- 4 Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, et al. Global genes expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. Cancer Res, 2002, 62: 233 ~ 240
- 5 Cavalli L R, Liang B C. Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved? Mutat Res, 1998, 398: 19 ~ 26

- 6 Baggetto L G. Role of mitochondria in carcinogenesis. *Eur J Cancer*, 1993, 29A: 156 ~ 159
- 7 Bianchi N O, Bianchi M S, Richard S M. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res*, 2001, 488: 9 ~ 23
- 8 Penta J S, Johnson F M, Wachsman J T, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res*, 2001, 488: 119 ~ 133
- 9 Lu X, Walker T, MacManus J P, et al. Differentiation of HT-29 human colonic adenocarcinoma cells correlates with increased expression of mitochondrial RNA: effects of trehalose on cell growth and maturation. *Cancer Res*, 1992, 52: 3718 ~ 3725
- 10 Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, et al. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. *Eur J Cancer*, 1999, 35: 316 ~ 319
- 11 Habano W, Sugai T, Nakamura S I, et al. Mitochondrial instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2000, 118: 835 ~ 841
- 12 Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, et al. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat*, 1999, 14: 333 ~ 339
- 13 Van Den Bosch B J, De Coe R F, Scholte H R, et al. Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denature high performance liquid chromatography. *Nucl Acids Res*, 2000, 28: E89
- 14 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6.46; 9.16 ~ 9.22
- 15 Levin B C, Cheng H Y, Reeder D J. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics*, 1999, 55: 135 ~ 146
- 16 Parrella P, Xiao Y, Fliss M, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res*, 2001, 61: 7623 ~ 7626
- 17 Fliss M S, Usadel H, Caballero O L, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, 2000, 287: 2017 ~ 2019
- 18 Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Detection of somatic mutation in the mitochondrial control of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis*, 1997, 18: 682 ~ 685
- 19 Maximo V, Soares P, Seruca R, et al. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutation in gastric carcinoma. *Gene Chromosomes & Cancer*, 2001, 32: 136 ~ 143
- 20 Jerónimo C, Nomoto S J, Caballero O L, et al. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene*, 2001, 20: 5195 ~ 5198
- 21 Beyer R E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an oxidant. *Biochem Cell Biol*, 1992, 70: 390 ~ 403
- 22 Bandy B, Davison A J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med*, 1990, 8: 523 ~ 539
- 23 Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2001, 61: 1843 ~ 1845
- 24 Habano W, Sugai T, Yoshida T, et al. Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Nat Genet*, 1999, 83: 625 ~ 629
- 25 Yeh J J, Lunetta K L, van Orsouw N J, et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutation in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in case with thyroid tumors. *Oncogene*, 2000, 19: 2060 ~ 2066

(2002-04-30 收稿, 2002-06-10 收修改稿)