线粒体脱氧鸟苷激酶在肺癌肿瘤发生中的作用及机制研究

孙瑞^{1,2†}, 胡元昭^{3†}, 商容磊^{1,2}, 白韦钰^{1,2}, 孙建伟^{1,2*}

1. 云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650091;

2. 云南大学生命科学学院, 生命科学研究中心, 昆明 650091;

3. 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: jwsun@ynu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-10; 接受日期: 2019-06-06; 网络版发表日期: 2019-07-02

国家自然科学基金(批准号: 31671448)资助

摘要 线粒体脱氧鸟苷激酶(*dguok*)缺失或者突变是造成线粒体DNA缺失综合征的主要原因. 目前*dguok*在肿瘤发生和发展中的作用及机制尚未明确. 我们发现在肺癌细胞中敲除*dguok*可以降低癌干细胞的球形成, *dguok*缺失不仅造成了线粒体形态改变, 而且严重影响了线粒体的耗氧率(OCR). 虽然*dguok*缺失可以造成线粒体DNA拷贝数的降低, 但在肺癌细胞H1650中并没有显著降低线粒体DNA编码的基因的mRNA水平, 蛋白质谱分析表明*dguok*缺失后显著降低线粒体复合体I组分NDUFB8的蛋白水平, 但是并不影响*ndufb8*的mRNA水平, 表明*dguok*缺失通过影响线粒体复合体I的组装来影响线粒体的功能及肿瘤的发生.

关键词 脱氧鸟苷激酶, 线粒体, 呼吸链复合体I, 肿瘤发生

癌症是目前人们最关注的健康问题, 也是医学上难以攻克的课题之一. 目前在我国, 癌症的发病率呈现爆发式增长. 如何抑制癌症发生、提高癌症病人的生存期已成为目前国际社会研究的热点问题, 也是目前医学亟待解决的问题. 肺癌是目前我国癌症发病率和致死率最高的癌症, 因此, 研究肺癌的发生和发展机制将有助于肺癌的防控及精准治疗, 提高肺癌病人的存活率.

线粒体是细胞能量代谢中心, 是细胞进行有氧呼吸的主要场所, 为生命活动提供大量的能量, 与很多

人类疾病存在着莫大的联系, 这其中与癌症的关系更为密切. 线粒体功能失调是影响癌症发生及发展的主要因素之一^[1], 抑制线粒体功能可以控制癌症的发生及发展^[2]. 因此, 深刻认识线粒体功能调控机制, 对于癌症治疗极其重要. 线粒体是细胞中制造能量的一种半自主的细胞器, 其性状和功能由细胞核基因和线粒体基因共同决定. 脱氧鸟苷激酶(deoxyguanosine kinase, DGUOK)是由细胞核基因编码的定位于线粒体的负责催化嘌呤脱氧核糖核苷酸的合成的关键蛋白. *dguok*缺失会影响线粒体DNA(mtDNA)的合成和修复,

引用格式: 孙瑞, 胡元昭, 商容磊, 等. 线粒体脱氧鸟苷激酶在肺癌肿瘤发生中的作用及机制研究. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 893–901
Sun R, Hu Y Z, Shang R L, et al. Role and mechanism of mitochondrial deoxyguanosine kinase in lung cancer tumorigenesis (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 893–901, doi: 10.1360/SSV-2019-0089

使mtDNA数量下降,引起一系列线粒体DNA耗竭综合征(mitochondrial DNA depletion syndrome, MDS)^[3-5].

真核细胞中有两个不同的脱氧核苷酸(dNTP)池:细胞质中的dNTP参与基因组DNA的复制;线粒体中dNTP通过线粒体脱氧核苷挽救合成途径在整个细胞周期中维持平衡,是mtDNA复制的关键.脱氧核苷酸从头合成胞质dNTP已在癌症中得到广泛研究,被认为是肿瘤发生过程中最常见的失调通路之一^[6].然而线粒体dNTP代谢在癌症中的作用尚不清楚.DGUOK是负责线粒体中dNTP池代谢平衡的重要因子.已有研究表明,*dguok*的表达升高相对其他基因的表达在组织转化中尤为重要^[7].但*dguok*参与的线粒体脱氧核苷酸合成挽救通路在肿瘤发生及发展中的作用尚未见报道.

本文以非小细胞肺癌细胞(H1650, A549)为实验材料,通过CRISPR-CAS9技术在H1650, A549中敲除*dguok*后并验证*dguok*在肿瘤发生中的作用及机制.球形形成实验表明,*dguok*敲除后,显著降低细胞克隆的形成以及细胞球形形成效率;免疫染色和Seahorse实验分析结果表明,*dguok*缺失改变线粒体的形态及耗氧率,说明*dguok*缺失后影响了线粒体的功能.通过质谱分析、荧光定量PCR、蓝色非变性凝胶电泳等实验,发现*dguok*敲除后,mtDNA显著降低,但是线粒体DNA编码的基因的mRNA并没有明显降低,*dguok*缺失大大降低了线粒体呼吸链复合体I组分NDUFB8的蛋白水平,进而影响线粒体呼吸链复合体I的水平.本研究结果表明,*dguok*通过影响线粒体呼吸链复合体I的水平来影响线粒体功能进而调控肺癌细胞的发生和发展.

本研究初步揭示*dguok*线粒体脱氧核苷挽救通路在肿瘤发生的作用机制,通过调控线粒体的功能,进而影响肿瘤发生.本研究结果为肿瘤的治疗提供了新的策略,同时也为DGUOK成为肿瘤治疗的靶点提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

肺癌细胞株H1650, A549分别在添加10%胎牛血清和1%青霉素链霉素的RPMI1640和DMEM培养基中培养,37℃,饱和湿度,5%CO₂条件下常规培养.

1.2 CRISPR-CAS9基因敲除

*dguok*基因敲除,采用张峰实验室的方法^[8],在<http://crispr.mit.edu/>输入所要敲除基因N端的序列,设计基因敲除引物,将靶向*dguok*的基因敲除引物(敲除引物靶向序列:ACTTAGAAAGAGGCGGCCCG)构建到pLenti CRISPR V2载体(Addgene#52961)上.采用PEI转染法将CRISPR V2敲除质粒和慢病毒包装质粒转染到293T细胞中进行病毒包装,用包装好的病毒侵染H1650, A549细胞,侵染24 h后更换新鲜培养基,侵染48 h后对细胞进行筛选,筛选7天后对获得的稳定细胞株进行Western blot检测.

1.3 Western blot

待细胞生长状态一致、良好,吸去培养基,并用预冷的1×PBS缓冲液将残留的培养基洗去,用预冷的RIPA细胞裂解液(50 mmol L⁻¹ Tris-Cl(pH 7.4); 150 mmol L⁻¹ NaCl; 1 mmol L⁻¹ PMSF; 1 mmol L⁻¹ EDTA; 1% Triton-X; 0.1% SDS)中裂解1 min,超声破碎3次.11000×g, 4℃离心10 min,取上清. BCA法测定蛋白浓度,50 μg蛋白,95℃加热5 min后SDS-PAGE分离,并转移到PVDF膜上,用5%(质量体积比)溶于TBST(0.05% Tween 20)缓冲液的脱脂奶粉室温孵育30 min,一抗4℃孵育2~16 h(根据抗体而定),二抗室温孵育60 min, ECL发光成像.

1.4 细胞球形形成效率

将H1650, A549细胞接种于超低附着96孔板中(Corning Inc.)接种密度为1×10⁴细胞/mL,接种体积为100 μL,细胞在干细胞选择性培养基中,37℃,培养10天,用Zeiss倒置显微镜观察照相.记录直径大于或等于100 μmol L⁻¹球体的数目,实验设置3个重复.

1.5 Seahorse细胞耗氧率测定

用Seahorse XF96细胞外流量分析仪测定细胞耗氧率(OCR),实验操作按照生产厂家推荐的步骤进行. H1650细胞接种在XF96微孔板(1×10⁴细胞/孔)过夜培养.在检测前30 min,将细胞培养液换成非缓冲培养基,并保持在非CO₂, 37℃培养箱中.用Seahorse XF细胞线粒体压力测试试剂盒进行耗氧率测定.测试记录开始之后依次注射1 μmol L⁻¹寡霉素(Oligomycin),

1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 解偶联剂(FCCP)和1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 鱼藤酮(Rotenone)/20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 抗霉素A(antimycin A).

1.6 线粒体提取

H1650细胞线粒体提取在4℃或冰上进行. 从培养皿刮取约 5×10^6 细胞, 用预冷的PBS将细胞刮下至15 mL离心管中, 200 $\times g$, 4℃, 离心2 min, 弃掉上清. 细胞沉淀悬浮于1 mL新鲜配制的线粒体提取缓冲液(Mitochondria Isolation Buffer, 200 mmol L⁻¹蔗糖, 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EGTA, 1 $\times$ Protease inhibitor, 用HEPES-KOH溶液调至pH 7.5), 并转移至2 mL离心管中. 用27.5G针孔注射器吹打细胞30~35次, 直至细胞破碎. 将细胞裂解液进行600 $\times g$, 4℃, 离心10 min, 将上清液转移到一个新的离心管中, 7000 $\times g$, 4℃, 离心10 min, 再用1 mL MIB悬浮洗涤沉淀, 7000 $\times g$ 离心10 min. 用250 μL MIB重悬线粒体, 采用BCA法测定线粒体蛋白含量.

1.7 蓝色非变电泳和免疫印迹

使用Thermo Scientific的非变性预制凝胶(Cat#BN1001)进行蓝色非变电泳分析. 使用Thermo Scientific的非变性样品制备试剂盒(Cat#BN2008)制备样品. 50 μg 线粒体颗粒与20 μL Blue-Native Sample Buffer (5 μL native sample buffer, 8 μL digitonin, 7 μL sterilized water)轻轻混合, 避免气泡形成, 在冰上孵育30 min; 然后20000 $\times g$, 4℃, 离心10 min. 取15 μL 上清液与试剂盒中2 μL 考马斯亮蓝G-250混合均匀并立即上样到3%~12%的非变性胶中. 正极电泳液为Thermo Scientific 1 $\times$ Native PAGE跑胶缓冲液(Cat#BN2001), 负极电泳液在1 $\times$ Native PAGE中加入0.2 g/L考马斯亮蓝G-250. 在4℃, 150 V电泳30 min后, 对负极缓冲液进行更换(更换为负极:正极缓冲液混合的比例为1:10), 然后4℃, 250 V电泳60 min.

用转移缓冲液(Cat#np00061)洗涤凝胶3次, 然后在室温孵育20 min. 将凝胶上的蛋白质转移到PVDF膜上(300 mA, 120 min). 转膜完成后, PVDF膜用8%乙酸固定10 min后, 用去离子水冲洗3次(5 min/次), 之后将PVDF膜在空气中完全干燥. 将干燥的PVDF膜用100%甲醇洗涤3次(5 min/次), 再用去离子水洗涤3次(5 min/次), 用5%脱脂奶粉封闭30 min后, 用线粒体呼吸链复合物各自的抗体对其进行免疫印迹分析.

1.8 mtDNA拷贝数分析

DNA提取使用基因组DNA提取试剂盒(Tiagen, Cat#DP304-03). 刮取约 1×10^6 个H1650细胞, 按照试剂盒使用说明提取总DNA, 加入RNase A, 去除RNA. 采用线粒体引物和基因组引物作为q-PCR, 线粒体引物分别采用扩增mt-nd1和mt-nd2的引物, 基因组引物采用扩增Alu和B2M的引物. 引物序列如下:

mt-nd1 q-PCR-F: 5'-TCAAACCTCAAACCTACGCCC-TG-3';
mt-nd1 q-PCR-R: 5'-GTTGTGATAAGGGTGGAGAGG-3';
mt-nd2 q-PCR-F: 5'-TGTTGGTTATACCCTTCCCG-TACTA-3';
mt-nd2 q-PCR-R: 5'-CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGA-3';
Alu q-PCR-F: 5'-CTTGCACTGAGCCGAGATT-3';
Alu q-PCR-R: 5'-GAGACGGAGTCTCGCTCTGTGTC-3';
B2M q-PCR-F: 5'-GCTGGGTAGCTCTAAACAATGT-ATTCA-3';
B2M q-PCR-R: 5'-CCATGTACTAACAAATGTCTAA-AATGGT-3'.

1.9 q-PCR基因水平分析

用RNA提取试剂盒(Qiagen, Cat#74106)提取H1650细胞的总RNA, 用1 μg 总RNA为模板进行反转录. 将得到的cDNA, 用DEPC水稀释至200 μL , 取5 μL 作为q-PCR的模板, 用Bio-Rad q-PCR仪扩增, 反应试剂盒采用Transgene公司(北京, 中国)的q-PCR Master Mix (AQ131-02).

采用的引物序列如下:

mt-nd1 q-PCR-F: 5'-TCAAACCTCAAACCTACGCC-CTG-3';
mt-nd1 q-PCR-R: 5'-GTTGTGATAAGGGTGGAGAGG-3';
mt-nd2 q-PCR-F: 5'-TGTTGGTTATACCCTTCCCG-TACTA-3';
mt-nd2 q-PCR-R: 5'-CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGA-3';
CYT B q-PCR-F: 5'-CCCCAATACGCAAACTA-ACC-3';

CYT B q-PCR-R: 5'-AAGGAGTGAGCCGAA-GTTTC-3';
 COX1 q-PCR-F: 5'-GCCATAACCCAATACCAAA-CG-3';
 COX1 q-PCR-R: 5'-TTGAGGTTGCGGTCTGT-TAG-3';
 COX2 q-PCR-F: 5'-CTAGTCCTGTATGCCCTT-TTCC-3';
 COX2 q-PCR-R: 5'-GTAAAGGATGCGTAGG-GATGG-3';
 ATPase 6 q-PCR-F: 5'-AACCATTAACCTTCCCTCTA-CAC-3';
 ATPase 6 q-PCR-R: 5'-GAAGTGTGAAAACGTA-GGCTTG-3';
 16S rRNA q-PCR-F: 5'-GGGACCTGTATGAA-TGGCTC-3';
 16S rRNA q-PCR-R: 5'-TCTCGTCTTGCTGT-GTTATGC-3';
 GAPDH q-PCR-F: 5'-TGAAGGTCGGAGTCAA-CGG-3';
 GAPDH q-PCR-R: 5'-AGAGTTAAAAGCAGCCC-TGGTG-3'.

1.10 免疫荧光染色

接种 8×10^4 个H1650细胞于Gelatin处理的盖玻片上过夜培养。用新鲜配制的4%多聚甲醛于室温固定20 min, TBS冲洗3次, 用打孔封闭液(2% BSA, 0.1% Triton X-100溶于PBS缓冲液)处理细胞30 min, 之后与一抗孵育(兔抗Tom20, 用于线粒体染色); 之后细胞与荧光标记二抗孵育60 min, 然后室温与DAPI孵育10 min, 每个步骤之间用TBS进行充分清洗。最后使用荧光封片剂封片, 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察拍照分析。

1.11 抗体

本研究所用抗体如表1所示。

2 结果

2.1 *dguok*缺失降低肿瘤干细胞的球形成

肿瘤干细胞在大恶性肿瘤的发生、复发、转移和

抗药等方面发挥非常重要的作用。球形成是一种常用的体外研究肿瘤干细胞自我更新能力的方法^[9]。为了研究*dguok*在肿瘤发生中的作用, 选取H1650和A549肺癌细胞为实验对象, 将*dguok*基因敲除。通过Western blot验证(图1A和D), 发现DGUOK在敲除细胞中检测不到信号, 表明本实验成功构建了*dguok*敲除的H1650和A549稳定细胞系。

通过球形成实验, 发现*dguok*敲除后, 显著降低了球的形成(图1B, C和E和F)。这表明*dguok*的缺失影响了癌干细胞的自我更新能力, 说明*dguok*与肿瘤的发生、发展有重要联系。

2.2 *dguok*缺失影响线粒体形态及功能(耗氧率)

DGUOK是定位于线粒体中负责嘌呤脱氧核苷酸补救合成途径的限速酶^[10], 为了进一步解析DGUOK在癌症发生发展中的作用机制, 通过免疫染色和Seahorse Assay检测了*dguok*敲除后对线粒体的形态和功能的影响。免疫染色采用激光共聚焦显微镜拍照, 结果显示*dguok*缺失造成线粒体变短并片段化, 同时线粒体集中在细胞核周围(图2A)。

为了验证*dguok*缺失后对线粒体功能的影响, 通过Seahorse Assay实验检测, 发现在H1650细胞中, *dguok*缺失显著抑制线粒体的耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)(图2B), 也抑制了保留的耗氧率和ATP-linked的耗氧率。这表明*dguok*在调控肺癌细胞线粒体呼吸代谢中起着关键作用(图2C和D)。同时也表明*dguok*参与线粒体功能的调控, 基因敲除*dguok*可能会通过抑制线粒体的呼吸代谢来影响肿瘤的发生。

2.3 *dguok*不影响线粒体编码基因的mRNA水平

先前研究发现, *dguok*突变会引起线粒体DNA(mtDNA)耗竭综合征。为验证在肿瘤细胞中*dguok*是否通过影响线粒体DNA的拷贝数来影响线粒体功能, 通过q-PCR来检测*dguok*缺失后mtDNA的水平。结果发现, *dguok*缺失可以导致H1650细胞中线粒体DNA降低40%(图3A)。然而本实验发现当*dguok*敲除后, 线粒体编码基因的mRNA水平变化很小, 而且mt-nd2的mRNA显著升高(图3B), 说明虽然*dguok*缺失可以导致线粒体mtDNA拷贝数减少, 但是在癌细胞中并没有影响到线粒体DNA编码基因的表达。

表 1 本研究所用抗体信息

Table 1 List of all the antibodies used in this study

抗体名称	稀释比例	来源	货品号#
DGUOK anti-human	1:5000	Santa cruz(上海, 中国)	sc-398101
TOM20	1:5000	Santa cruz	sc-11415
Anti-Rabbit, HRP	1:5000	CST(上海, 中国)	7074s
Anti-Mouse, HRP	1:5000	CST	7076s
NDUFB8 Antibody(20E9DH10C12)	1:1000	Thermo Fisher (上海, 中国)	459210
SDHA antibody	1:1000	Santa cruz	Sc-390381
Monoclonal Anti-GAPDH antibody	1:5000	Sigma(上海, 中国)	G8795
Alexa 488 goat anti-rabbit	1:1000	Thermo Fisher	A11008

图 1 *dguok*敲除降低肺癌干细胞的球形形成。A: Western blot显示, *dguok*在H1650中被完全敲除; B: *dguok*敲除后抑制了H1650细胞球形形成; C: 数据量化*dguok*敲除抑制了H1650细胞球形形成; D: Western blot显示, *dguok*在A549中被完全敲除; E: *dguok*敲除抑制了A549细胞球形形成; F: 数据量化*dguok*敲除抑制了A549细胞球形形成。***: $P < 0.001$

Figure 1 *dguok* deletion reduced Sphere formation. A: Western blot showed that *dguok* was completely knocked out in H1650 cells; B: *dguok* knockout inhibited sphere formation in H1650 cells; C: Quantified data indicated *dguok* knockout inhibits sphere formation in H1650 cells; D: Western blot showed that *dguok* was completely knocked out in A549 cells; E: *dguok* knockout inhibited sphere formation in A549 cells; F: Quantified data indicated *dguok* knockout inhibits sphere formation in A549 cells. ***: $P < 0.001$

2.4 *dguok*影响线粒体复合体 I 的水平

为了进一步研究*dguok*是如何影响线粒体的功能进而影响肿瘤发生及发展,通过质谱分析,发现线粒体复合体 I 的组分NDUFB8在蛋白水平显著降低。Wes-

tern blot分析显示, *dguok*基因敲除后显著降低了NDUFB8的蛋白水平,但并没有明显降低*ndufb8* mRNA水平,推测*dguok*缺失可能影响线粒体复合体 I 的水平,为此,提取对照和*dguok*缺失H1650细胞

图 2 *dguok*缺失对线粒体形态和功能的影响。A: *dguok*缺失影响线粒体的形态; B: *dguok*缺失影响了线粒体的耗氧率; C: *dguok*缺失显著抑制了线粒体的保留耗氧率; D: *dguok*缺失显著抑制了ATP-linked 耗氧率。***: $P < 0.001$

Figure 2 Effects of *dguok* deletion on mitochondrial morphology and function. A: *dguok* deletion affects mitochondrial morphology; B: *dguok* deletion affects mitochondrial OCR; C: *dguok* deletion significantly inhibited mitochondrial reserved OCR; D: *dguok* deletion significantly inhibited mitochondrial ATP-linked OCR. ***: $P < 0.001$

图 3 *dguok*缺失对线粒体DNA拷贝和mRNA水平的影响。A: *dguok*缺失降低线粒体DNA的拷贝数。q-PCR分析以线粒体基因(*mt-nd1*或*mt-nd2*)引物为测试引物, 基因组基因(*Alu*或*B2M*)引物为内参引物; B: *dguok*缺失并不明显降低线粒体DNA编码基因的mRNA水平。q-PCR分析以线粒体基因为测试对象, GAPDH引物为内参引物。***: $P < 0.001$

Figure 3 Effects of *dguok* deletion on mitochondrial DNA copy and mRNA level. A: *dguok* deletion reduces mtDNA level; B: *dguok* deletion did not significantly reduce the mitochondrial DNA-coding gene mRNA level. ***: $P < 0.001$

的线粒体, 并通过BN-PAGE实验发现, *dguok*缺失显著降低了线粒体复合体 I 的水平。作为对照, *dguok*缺失并没有影响线粒体复合体 II 的水平(图4C), 说明*dguok*缺失导致了NDUFB8的蛋白水平降低进而影响了线粒

体复合体 I 的水平。

本研究结果表明, 在癌细胞中, *dguok*调控线粒体复合体 I 的水平, 但DGUOK本身并不是线粒体复合体 I 的组成部分, 暗示*dguok*可能参与线粒体复合

图 4 *dguok* 调控线粒体复合体 I 的水平. A: *dguok* 缺失降低了线粒体复合体 I 组分 NDUFb8 的蛋白水平; B: *dguok* 缺失不影响 *ndufb8* 的 mRNA 水平; C: *dguok* 缺失影响线粒体呼吸复合体 I 的水平, 作为对照并没有影响线粒体呼吸复合体 II 的水平

Figure 4 Regulation of mitochondrial complex I level by *dguok*. A: *dguok* deletion reduces the protein NDUFb8 level, a component of mitochondrial complex I; B: *dguok* deletion does not affect the *ndufb8* mRNA level; C: *dguok* deletion reduces the mitochondrial respiratory complex I level, but does not affect the mitochondrial respiratory complex II level

体 I 的组装.

3 讨论

线粒体功能失调是造成癌症发生的主要原因之一, 在癌症细胞中, 线粒体的生物合成和质量控制都普遍上调了. 另外一些癌细胞中存在线粒体三羧酸循环相关酶的基因突变, 会导致与癌症相关的代谢改变. 线粒体功能对肿瘤的发生发展起着重要的调控作用^[11,12]. 所以靶向线粒体已经成为控制癌症发生及发展的重要手段之一.

线粒体由于缺乏核苷酸从头合成途径, 只能依赖核苷酸补救合成途径, 因此游离核苷酸浓度的稳定对于线粒体 DNA 的复制至关重要, 一旦失衡将导致 mtDNA 拷贝数下降. *dguok* (脱氧鸟苷激酶) 是线粒体中负责脱氧嘌呤核苷合成的重要激酶. 已有研究表明, *dguok* 在转化组织中的表达量相对于其他基因更高^[7], 暗示 *dguok* 高表达可能在肿瘤发生及转化中起更重要的作用. 虽然 *dguok* 缺失导致 mtDNA 拷贝数降

低, 但是本实验发现 mtDNA 拷贝数的降低并没有导致癌细胞线粒体编码基因 mRNA 水平的明显降低, 说明在癌细胞中可能存在某种遗传补偿机制来抵消 mtDNA 水平降低所带来的影响, 其中的机制有待于进一步研究.

无论从发病率还是死亡率, 肺癌都高居各种癌症之首^[13], 肺癌是中国癌症病人的第一杀手. 大多数肺癌患者最终死于局部或转移性复发, 然而对于肺癌发生的机制并不十分清楚. 本研究结果表明, *dguok* 参与的线粒体功能调控在肺癌发生中的作用. 癌干细胞是具有干细胞活性的癌细胞, 具有自我更新和分化能力. 癌干细胞在肿瘤发生/发展中起重要作用. 已有研究表明, 癌干细胞在肿瘤的抗药性中也起着非常重要的作用^[14,15], 但是目前对影响癌干细胞生长的因素并不十分清楚. 本实验结果表明, 基因敲除 *dguok* 可以显著抑制癌干细胞的球形成, 说明抑制线粒体合成补救途径中核苷酸的生物合成可以作为药物靶点去抑制肿瘤发生和发展. 本研究结果将为癌症病人的治疗提供新的策略, 为以后癌症药物的研发提供新的靶点.

参考文献

- 1 Zong W X, Rabinowitz J D, White E. Mitochondria and cancer. *Mol Cell*, 2016, 61: 667–676
- 2 Guerra F, Arbini A A, Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2017, 1858: 686–699

- 3 Deng M, Lin W, Guo L, et al. Clinical features and DGUOK mutations of an infant with mitochondrial DNA depletion syndrome (in Chinese). *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2016, 18: 545–550 [邓梅, 林伟霞, 郭丽, 等. 线粒体DNA耗竭综合征1例临床特点和DGUOK基因突变分析. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18: 545–550]
- 4 Doty A. Transition strategies for adolescents & young adults who use AAC. *Phys Occupational Ther Pediatrics*, 2011, 31: 451–452
- 5 Caporali L, Bello L, Tagliavini F, et al. DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions. *Brain*, 2018, 141: e3
- 6 Mathews C K. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 528–539
- 7 Gandhi V V, Samuels D C. Correlated tissue expression of genes of cytoplasmic and mitochondrial nucleotide metabolisms in normal tissues is disrupted in transformed tissues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2012, 31: 112–129
- 8 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 9 Bahmad H F, Cheaito K, Chalhoub R M, et al. Sphere-formation assay: Three-Dimensional in vitro culturing of prostate cancer stem/progenitor sphere-forming cells. *Front Oncol*, 2018, 8: 347
- 10 El-Hattab A W, Craigen W J, Scaglia F. *Mitochondrial DNA maintenance defects*. *BioChim Biophysica Acta (BBA) - Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 1539–1555
- 11 Emmings E, Mullany S, Chang Z, et al. Targeting mitochondria for treatment of chemoresistant ovarian cancer. *IJMS*, 2019, 20: 229
- 12 Pokorný J, Pokorný J, Kobilková J, et al. Targeting mitochondria for cancer treatment—two types of mitochondrial dysfunction. *Prague Med Rep*, 2014, 115: 104–119
- 13 Ramalingam S S, Owonikoko T K, Khuri F R. *Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances*. *CA-A Cancer J Clinicians*, 2011, 61: 91–112
- 14 Lee K M, Giltmane J M, Balko J M, et al. MYC and MCL1 cooperatively promote chemotherapy-resistant breast cancer stem cells via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 2017, 26: 633–647.e7
- 15 Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, et al. MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab*, 2015, 22: 590–605

Role and mechanism of mitochondrial deoxyguanosine kinase in lung cancer tumorigenesis

SUN Rui^{1,2}, HU YuanZhao³, SHANG RongLei^{1,2}, BAI WeiYu^{1,2} & SUN JianWei^{1,2}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2 Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China;

3 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Deletion or mutation of mitochondrial deoxyguanosine kinase (*dguok*) is a major cause of mitochondrial DNA deletion syndrome. However, the role and mechanism of *dguok* in tumorigenesis have not been documented. We found that deletion of *dguok* in lung cancer H1650 cells reduced the Sphere formation, an indicator of cancer stem cell growth. *dguok* deletion not only caused the morphological changes of mitochondria, but also dramatically decreased the oxygen consumption rate (OCR). Although *dguok* deletion reduced the number of mitochondrial DNA copies, it did not significantly reduce the mRNA level of mitochondrial DNA-coding genes. Further analysis showed that *dguok* deletion considerably lowered the protein level of NDUF8, a component of mitochondrial complex I, but did not affect the mRNA level of *nduf8*. These findings suggested that *dguok* affected mitochondrial function and tumorigenesis through regulation of mitochondrial complex I level.

deoxyguanosine kinase, mitochondria, mitochondrial complex I, tumorigenesis

doi: [10.1360/SSV-2019-0089](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0089)