

文章编号: 1004-0374(2009)02-0291-04

## 线粒体 DNA 与 DNA 甲基化的关系

王 萍, 房静远\*

(上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001)

**摘 要:** 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 遗传信息量虽小, 却控制着线粒体一些最基本的性质, 对细胞及其功能有着重要影响。mtDNA 的损伤与衰老、肿瘤等疾病的发生有关。DNA 甲基化是调节基因表达的重要方式之一。mtDNA 基因的表达受核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 的调控, mtDNA 和 nDNA 协同作用参与机体代谢调节和发病。本文就近年来 mtDNA 与 DNA 甲基化的关系作一综述。

**关键词:** 线粒体 DNA; DNA 甲基化; 基因表达; 疾病

**中图分类号:** Q523; Q244; Q786 **文献标识码:** A

## The relationship between mitochondrial DNA and DNA methylation

WANG Ping, FANG Jing-yuan\*

(Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China)

**Abstract:** Mitochondrial DNA (mtDNA) determines the primary nature of mitochondrial and plays an important role in cell function. The damage of mtDNA is associated with aging, tumor and other diseases. DNA methylation is a major way to regulate gene expression. mtDNA expression is regulated by nuclear DNA. mtDNA and nDNA participating in metabolic regulation and pathogenesis synergistically. The relationship between mitochondrial DNA and DNA methylation were reviewed here.

**Key words:** mitochondrial DNA; DNA methylation; gene expression; disease

线粒体是真核细胞的能量代谢中心, 其生物学功能受细胞核和线粒体自身两个遗传体系的控制, 许多线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 和相关核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 的变异与衰老、神经退行性疾病、糖尿病以及肿瘤等疾病的发生有关。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要组成部分之一, 对基因的表达起重要调节作用。mtDNA 和 nDNA 均参与组织特异性的形成、细胞代谢及疾病发生。本文就 mtDNA 与 DNA 甲基化的关系作一综述。

### 1 线粒体 DNA 的结构特征

线粒体是动物细胞中除核以外唯一含有 DNA 的细胞器。1981年, Anderson 等完成了 mtDNA 全序列的测定, 并绘制了详细的功能图谱<sup>[1]</sup>。mtDNA 呈双链闭环结构, 全长 16 569bp, 分为轻链(L链)和重链

(H 链), 两条链均具有独立编码功能。mtDNA 由编码区和非编码区(包括 D-loop 区)组成。编码区编码参与氧化磷酸化和生成 ATP 所必需的多肽, 而非编码区包含了重链的复制起点、重链和轻链的转录启动子, 是 mtDNA 分子复制和转录的调控中心。mtDNA 含有 37 个基因, 包括 2 个 rRNA 分子、22 个 tRNA 分子和编码氧化磷酸化系统的 13 个蛋白质亚单位<sup>[2]</sup>。

人类 mtDNA 的大小与 nDNA 的  $6 \times 10^9$  bp 的组成相比相差甚远。但是, mtDNA 的突变有其独特的遗传特征: (1) 母系遗传。(2) 异质性: 线粒体基因突变可以产生突变含量介于 0 到 100% 之间的

收稿日期: 2008-10-14; 修回日期: 2009-03-04

\*通讯作者: jingyuanfang@yahoo.com

mtDNA 突变体, 人们将细胞或组织同时存在突变型和野生型 mtDNA 的状态称为异质性。(3) 阈值效应(threshold effect): 当突变负荷超过一定范围, 野生型 mtDNA 的数量不能维持呼吸链的功能时, 组织或器官就会出现异常, 这种现象称为阈值效应。人体不同组织、器官对 mtDNA 突变的易感性存在差异, 能量需求低的部位(如肺、皮肤和韧带)对突变不敏感, 较高的突变负荷才能引发异常情况, 即阈值高; 能量需求高的部位(如骨骼肌、脑、心、肾小管和内分泌腺)容易受突变影响, 较低的突变负荷就能引起临床症状, 即阈值低。(4) 广谱性: mtDNA 的任何突变都可能累及人体基因组中的重要功能区域部分, 因此病理性 mtDNA 的突变比 nDNA 突变更为常见。(5) 高突变率: mtDNA 的突变率比 nDNA 高 10 倍以上<sup>[3,4]</sup>。

## 2 线粒体 DNA 的损伤

有许多原因引起 mtDNA 的损伤, 包括物理因素、化学因素、药物、衰老等。最常见的是缺血缺氧引起氧自由基及一氧化氮增多和 ATP 生成减少, 进而造成线粒体功能损伤、细胞凋亡和肿瘤发生等。与 nDNA 相比, mtDNA 更容易受到氧化损伤和诱变因素的攻击, 原因可能在于: (1) 线粒体内膜的脂类含量高, 亲脂性诱导突变的化合物容易在 mtDNA 附近积聚; (2) mtDNA 几乎不受组蛋白保护; (3) mtDNA 缺乏完善的 DNA 切除修复机制; (4) mtDNA 中除了一小段 D 环区域外, 其他序列无内含子, 因此, 任何 mtDNA 的突变都会影响到其基因组内的一个重要功能区域; (5) 线粒体内氧浓度很高, 易产生氧自由基及过氧化氢等活性氧簇(ROS), 但本身不能合成谷胱甘肽将其有效去除; (6) mtDNA 在整个细胞周期中都处于不断合成状态, 易受外界干扰, 稳定性差<sup>[5,6]</sup>。产生的 mtDNA 损伤主要表现在: (1) mtDNA 结构改变: 有核酸片段缺失、碱基修饰、插入突变等, 其中以 mtDNA 缺失最常见。Kim 等<sup>[7]</sup>提出 mtDNA 缺失主要发生在 DNA 损伤后的修复阶段。(2) mtDNA 拷贝数的改变。(3) mtDNA 的核内整合: 当细胞内外环境有害因素增加时, mtDNA 可能会整合到核基因组中, 而如果该整合恰好发生在癌基因或抑癌基因上, 使癌基因激活或抑癌基因失活, 则可能导致癌症的发生。Shay 和 Werbin<sup>[8]</sup>在对 HeLaTG 细胞的研究中, 发现了整合在核基因组 C-myc 基因位点中的细胞色素 C 氧化酶亚单位 III, 产生的融合 mtRNA 同时具有 C-myc

和细胞色素 C 氧化酶亚单位 III 的遗传信息。

## 3 DNA 甲基化

表观遗传学与传统意义上的遗传学不同, 是指可以影响基因转录活性而不涉及 DNA 序列的改变, 包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重构和 RNAi 调控。所谓 DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)二核苷酸的胞嘧啶中 5 位碳原子上。Dnmt1 主要起维持甲基化作用, Dnmt3a 和 Dnmt3b 则以从头甲基化为主<sup>[9]</sup>。多种基因的启动子区和第一外显子富含 CpG, 而 CpG 相对集中的区域称之为 CpG 岛。生理情况下 CpG 岛多为非甲基化状态。基因组中大约 80% 的 CpG 位点处于甲基化状态, 它们主要分布于占基因组 99% 的非 CpG 岛区、X 染色体、重复序列、原病毒等寄生性 DNA 序列中。细胞分裂复制的 DNA 子链必须进行适当地甲基化修饰, 否则遗传性不稳定、易变异, 其染色体脆性增加、易断裂<sup>[10]</sup>。异常的甲基化常发生在 CpG 岛, 导致基因的失活, 与肿瘤的发生发展密切相关。人类肿瘤发生中常有总基因组 DNA 甲基化水平降低、癌基因低甲基化或抑癌基因启动子区高甲基化<sup>[11]</sup>。

## 4 线粒体 DNA 与核 DNA 甲基化的关系

除 mtDNA 自身编码的 37 个基因外, 其余与线粒体结构和功能相关的基因均由 nDNA 编码, 在胞质中合成后再进入线粒体内发挥作用和 nDNA 编码线粒体的聚合酶、核糖体蛋白和结构蛋白。线粒体和核基因组之间的联系是双向的, 两者协同调控细胞凋亡和各种代谢途径<sup>[7]</sup>。线粒体转录因子(ATfam)是由 nDNA 编码的调节 mtDNA 复制的关键分子, 在启动子区含有许多潜在的能够被甲基化的 CpG 岛。在体外, Choi 等<sup>[12]</sup>将 Tfam 启动子连接荧光素酶报告基因, 分别在 SssI (CG)、HpaII (CCGG)及 HhaI (GCGC) 甲基化酶作用下使其甲基化, 再瞬时转染 HepG2 细胞, 然后检测荧光素活性。结果发现, 与未甲基化载体组比较, SssI 和 HpaII 作用的甲基化组和 SV 启动子驱动的对照组的荧光素酶活性的下降均小于 10%, 提示 SssI 和 HpaII 的作用位点不参与调节 Tfam 启动子活性。相反, 在 HhaI 作用下, 启动子活性抑制达到 24.4%, 而对对照组没有变化。存在于 Tfam 启动子上的核呼吸因子-1 结合区域包含 2 个 HhaI 作用位点, 并不包含 HpaII 位点, 提示核

呼吸因子-1区域甲基化是引起Tfam启动子表达沉默的一条途径,可以进一步减少mtDNA含量。这种甲基化作用导致的基因表达沉默可能参与调控线粒体生物发生和呼吸功能,进而引起人类许多疾病的发生。

同样,mtDNA损伤也会影响nDNA的甲基化状态。在缺血缺氧情况下,mtDNA中ROS引起氧化损伤的标志物8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量显著增多,而DNA甲基化水平降低<sup>[13]</sup>。在这过程中,8-OHdG抑制了胞嘧啶的甲基化形成以及干扰甲基化转移酶的功能,使DNA的甲基化水平改变,进而影响相关基因的表达。Smiraglia等<sup>[14]</sup>发现mtDNA拷贝数变化也可以影响nDNA的甲基化水平。他们通过基因组限制性酶切扫描技术发现肿瘤细胞的nDNA中有64个低甲基化区和50个高甲基化区。去除mtDNA后,有22个区域发生改变,其中17个出现低甲基化,5个转变成高甲基化。他们再次导入mtDNA后观察这些区域的变化,发现5个高甲基化区仍然保持甲基化状态,而17个低甲基化区域中的5个则重新出现甲基化。以上结果表明mtDNA减少或缺失可以引起表观遗传改变,这种现象是复杂的,呈部分可逆性,揭示mtDNA的拷贝数变化对调控nDNA的甲基化水平具有重要作用。

叶酸是DNA合成、修复和甲基化的必需物质之一。叶酸缺失可以引起遗传和表观遗传修饰的变化。同样,叶酸缺乏引起mtDNA的损伤,诱导mtDNA大片段缺失。mtDNA缺失和突变的累积在衰老和肿瘤发生的过程中起重要作用。Crott等<sup>[15]</sup>分别以不足量、足量和补充量的叶酸饲养大鼠20周,发现随着饮食中叶酸量的增加,大鼠肝脏中mtDNA缺失的发生率下降。与叶酸不足量组比较,足量组和补充量组mtDNA缺失发生率分别下降54.55%和68.75%。因此,补充叶酸可以减少mtDNA缺失的发生。

## 5 疾病与线粒体DNA、DNA甲基化

研究表明,线粒体DNA异常与衰老、神经退行性疾病、糖尿病以及肿瘤等疾病的发生有关,而DNA甲基化异常参与了肿瘤等疾病的发生发展。nDNA的甲基化改变可以预测肿瘤的预后,而mtDNA的低拷贝与肿瘤的预后不佳密切相关<sup>[14]</sup>,因此,推测两者之间可能存在联系,共同影响疾病的进展,现将近年来的相关报道进行以下介绍。

### 5.1 前列腺癌 Xie等<sup>[16]</sup>利用溴化乙啶诱导早期前列

腺癌的细胞株LNCaP产生mtDNA缺失、mtDNA减少和mtDNA正常三组细胞,分别研究这三种情况下内皮素B受体(the endothelin B receptor)、O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase)和E-钙黏附蛋白(E-cadherin)基因启动子的甲基化水平。然后去除诱导,mtDNA含量恢复后再观察甲基化的变化。研究发现mtDNA含量减少可以诱导基因甲基化,mtDNA的含量恢复后则甲基化水平下降。实验还发现mtDNA含量、DNMT1表达和相关基因启动子高甲基化水平三者之间关系密切,说明mtDNA含量可以调节肿瘤相关基因CpG岛的甲基化状态,mtDNA含量减少可能参与肿瘤的发展,检测mtDNA量可能成为估计肿瘤预后的重要手段之一。

**5.2 胃癌** RUNX3是一种抑癌基因,属于RUNXs,定位于1p36,其启动子甲基化可以使基因表达减少。Gargano等<sup>[17]</sup>检测了100例胃癌患者的肿瘤组织中基因组微卫星不稳定(nMSI)和线粒体微卫星不稳定(mtMSI)的变化,以及40例胃癌患者的RUNX3甲基化水平。结果发现55%胃癌患者存在RUNX3启动子甲基化,其中82%患者为稳定的微卫星不稳定,5%为低水平的微卫星不稳定,13%为高水平的微卫星不稳定(nMSI-H);11%患者发生mtMSI,进一步的研究显示nMSI-H、mtMSI和RUNX3甲基化有关,说明在胃癌发生过程中,RUNX3甲基化是导致mtMSI和nMSI-H的主要原因之一。

**5.3 糖尿病** Jin等<sup>[18]</sup>报道在2型糖尿病和胰岛素抵抗患者中存在线粒体功能障碍和mtDNA的突变或缺失,并且SAM与线粒体功能失调和胰岛素抵抗有关。他们研究了SAM与骨骼肌中线粒体密度和胰岛素敏感性的关系,结果发现予以SAM治疗的OLETF大鼠组,骨骼肌中mtDNA密度显著增加,并与胰岛素敏感性的提高呈相关性,因而证实SAM可以增加骨骼肌中mtDNA密度,从而进一步提高胰岛素敏感性。

**5.4 其他** Dhillon等<sup>[19]</sup>研究发现男性不育症与mtDNA缺失和GSTM1启动子甲基化有关,但两者之间具体联系还没有进一步的报道。

## 6 展望

mtDNA作为核外的遗传物质,控制着线粒体的基本功能,由于其分子结构简单、拷贝量多、无组织特异性,mtDNA突变与mtDNA相关疾病正越来越引起人们重视。mtDNA复制和转录都受nDNA

的调控, 已经证实 mtDNA 与 DNA 甲基化存在一定关联, 但具体机制尚不清楚, 比如两者之间相互影响的具体途径怎样? 何为始发因素? 相信随着研究的深入, 必将对相关疾病的诊断和预防产生深远意义。

### [参 考 文 献]

- [1] Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(9): 1188-99
- [2] Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database—2004 update. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D611-3
- [3] Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp*, 2001, 235: 247-63
- [4] Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 359-407
- [5] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 2005, 120(4): 483-95
- [6] Chien KR, Karsenty G. Longevity and lineages toward the integrative biology of degenerative diseases in heart, muscle and bone. *Cell*, 2005, 120(4): 533-44
- [7] Kim JK, Amy KR, David CS, et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet*, 2008, 40(3): 275-9
- [8] Shay JW, Werbin H. New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutat Res*, 1992, 275(3-6): 227-35
- [9] Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CpG island and pericentromeric satellite region in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer*, 2001, 91(2): 205-12
- [10] Costello JF, Fühwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, 2000, 24(2): 132-8
- [11] Fang JY, Xiao SD. Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(9): 960-8
- [12] Choi YS, Kim S, Kyu Lee H, et al. *In vitro* methylation of nuclear respiratory factor-1 binding site suppresses the promoter activity of mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(1): 118-22
- [13] Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, et al. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(4): 1261-4
- [14] Smiraglia DJ, Kulawiec M, Bistulfi GL, et al. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(8): 1182-90
- [15] Crott JW, Choi SW, Branda RF, et al. Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutat Res*, 2005, 570(1): 63-70
- [16] Xie CH, Naito A, Mizumachi T, et al. Mitochondrial regulation of cancer associated nuclear DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(3): 656-61
- [17] Gargano G, Calcara D, Corsale S, et al. Aberrant methylation within RUNX3 CpG island associated with the nuclear and mitochondrial microsatellite instability in sporadic gastric cancers. Results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell' Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol*, 2007, 18 (Suppl 6): vi103-9
- [18] Jin CJ, Park HK, Cho YM, et al. S-adenosyl-L-methionine increases skeletal muscle mitochondrial DNA density and whole body insulin sensitivity in OLETF rats. *J Nutr*, 2007, 137(2): 339-44
- [19] Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(4): 213-22