

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.010

· 基础研究 ·

结肠上皮细胞 NCM460 中线粒体 DNA 部分缺失诱导其恶性转化及免疫逃逸

杨东梅¹, 牟晶晶² (1. 华中科技大学同济医学院, 湖北省肿瘤医院腹部肿瘤内科, 湖北 武汉 430079; 2. 华中科技大学同济医学院, 湖北省肿瘤医院放疗中心, 湖北 武汉 430079)

[摘要] **目的:** 明确线粒体 DNA (mtDNA) 部分缺失对结肠上皮细胞 NCM460 的影响。**方法:** 通过溴化乙锭 (EB) 诱导建立 mtDNA 部分缺失细胞模型 (mtDNA-reduced) 及恢复模型 (reverted), 采用 CCK-8、活性氧 (ROS) 及线粒体膜电位检测评估线粒体功能, 通过葡萄糖、乳酸及糖酵解关键酶活性检测评估代谢表型, 通过 Transwell 实验及 WB 法检测细胞侵袭及上皮-间质转化 (EMT), 通过 polyHEMA 包被培养检测失巢凋亡抵抗能力; 检测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及程序性死亡配体 1 (PD-L1) 表达, 并通过 PI3K 抑制剂 LY294002 验证。**结果:** GEPIA 数据库分析显示 mtDNA 编码基因在结直肠癌中低表达 ($P < 0.05$); 组织芯片显示 COX1 蛋白在正常结肠组织高表达, 在癌组织中低表达 ($P < 0.05$)。mtDNA-reduced NCM460 细胞线粒体功能受损 (生长速率下降、ROS 生成减少、线粒体膜电位降低, $P < 0.05$), 呈现 Warburg 效应 (葡萄糖摄取增加、乳酸分泌增多、糖酵解关键酶活性增强, $P < 0.05$), 侵袭能力增强 ($P < 0.05$) 且发生 EMT, 并抵抗失巢凋亡 ($P < 0.05$)。该细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路激活且 PD-L1 表达上调; 经 LY294002 处理后, 葡萄糖含量有降低趋势 ($P > 0.05$)、细胞活性下降 ($P < 0.05$), PD-L1 表达下调 ($P < 0.05$)。**结论:** 结肠上皮细胞 NCM460 中 mtDNA 部分缺失可诱导其恶性转化及免疫逃逸。

[关键词] 线粒体 DNA; NCM460 细胞; 恶性转化; 免疫逃逸; Warburg 效应; 程序性死亡配体 1

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 02-0181-09

Mitochondrial DNA (mtDNA) partial depletion induces malignant transformation and immune escape in colonic epithelial cell NCM460

YANG Dongmei¹, MOU Jingjing² (1. Department of Abdominal Oncology, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430079, Hubei, China; 2. Department of Radiotherapy, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430079, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the effects of mitochondrial DNA (mtDNA) partial depletion on colonic epithelial cell NCM460. **Methods:** Mitochondrial DNA partially depleted cell model (mtDNA-reduced) and reversion model (reverted) were established by ethidium bromide (EB) induction. Mitochondrial function was evaluated by CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (JC-1) detection. Metabolic phenotypes were assessed by glucose, lactate and glycolytic key enzyme activity assays. Cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) were detected by Transwell invasion assay and Western blot. Anoikis resistance was examined by polyHEMA coated culture. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression were detected, and verified by PI3K inhibitor LY294002. **Results:** GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) database analysis showed that mtDNA-encoded genes were down-regulated in colorectal cancer ($P < 0.05$). Tissue microarray showed that cytochrome oxidase subunit 1 (COX1) protein was highly expressed in normal colonic tissues but lowly expressed in cancer tissues ($P < 0.05$). Mitochondrial DNA-reduced NCM460 cells showed impaired mitochondrial function (decreased growth rate, reduced ROS generation, and decreased mitochondrial membrane potential, $P < 0.05$), exhibited the Warburg effect (increased glucose uptake, enhanced lactate secretion, and increased glycolytic key enzyme activity, $P < 0.05$), enhanced invasion capacity ($P < 0.05$) with EMT, and resisted anoikis ($P < 0.05$). The PI3K/Akt/mTOR pathway was activated and PD-L1 expression was upregulated in these cells. After treatment with LY294002, the glucose content showed a decreasing trend ($P > 0.05$), the cell activity decreased ($P < 0.05$), and PD-L1 expression was downregulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Partial depletion of

[基金项目] 湖北省自然科学基金青年项目 (2021CFB267; 2021CFB294)

[作者简介] 杨东梅, 博士, 住院医师

[通信作者] 牟晶晶 (扫码获取作者联系方式)



mtDNA in colonic epithelial cell NCM460 can induce malignant transformation and immune escape.

[Key words] mitochondrial DNA (mtDNA); NCM460; malignant transformation; immune escape; Warburg effect; programmed death ligand 1 (PD-L1)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(2): 181-189. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.02.010]

从2000年到2018年,中国结直肠癌发病率显著增加^[1]。尽管医学发展迅速,但近十余年结直肠癌在生存率方面并没有较大的提升^[2],仍有60%的患者死于肿瘤的复发和转移^[3]。因此探索结直肠癌发生发展及侵袭转移的机制,寻找更为有效的检测指标进行早期诊断,以及探索新的有效治疗方法有着十分重要的意义。线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)在哺乳动物细胞中是细胞核外唯一的遗传物质,与细胞核DNA不同的是,mtDNA发生异常的频率较高,这是因为mtDNA没有组蛋白的保护,同时由于位于呼吸链附近,易受到氧化应激的损伤,且损伤后缺乏有效的修复机制。突变的mtDNA在细胞内不断复制和积累,产生大量突变的拷贝^[4-5]。mtDNA的异常包含DNA的突变和拷贝数的变化。研究表明mtDNA异常在许多常见疾病中起着重要作用,如线粒体肌病、神经退行性疾病、衰老和癌症等^[6-7]。目前在多种癌症中已经检测出mtDNA突变和拷贝数改变^[4]。在结直肠癌中已发现,与正常组织相比,癌组织中mtDNA拷贝数明显降低^[8-13]。与低级别结直肠肿瘤相比,高级别结直肠肿瘤中的mtDNA拷贝数较低。与低拷贝数组相比,高拷贝数组的患者生存期有延长的趋势^[14]。另有相关文献表明,与早期结直肠癌组织相比,晚期结直肠癌组织中mtDNA拷贝数下降更明显。mtDNA拷贝数明显下降的患者与中高拷贝数的患者相比无病生存期明显缩短^[9,15-16]。另有研究表明mtDNA缺失可能导致溃疡性结肠炎向肿瘤进展^[17]。但mtDNA拷贝数下降在结直肠癌中的具体作用目前尚不清楚。本研究从细胞水平验证mtDNA下降是否促进结直肠癌发生并明确其可能机制。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析与组织芯片检测

利用基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库,即基于TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据的可视化分析工具,以及组织芯片免疫组织化学方法检测mtDNA编码基因在结直肠癌组织和正常组织中的表达。

1.2 细胞与主要试剂

NCM460(人正常结肠上皮细胞),经短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分析鉴定。用含10%胎牛血清及1%青霉素和链霉素的RPMI 1640培养液在37℃、5%CO₂环境的培养箱中培养。

人结直肠癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司(已通过伦理审批)。细胞培养基购自美国Thermo Scientific公司。溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、丙酮酸钠、尿嘧啶核苷、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯[poly(2-hydroxyethyl methacrylate), polyHEMA]及Transwell小室(细胞侵袭/迁移实验用)均购自美国Sigma-Aldrich公司。组织/细胞基因组DNA提取试剂盒购自美国Omega Bio-tek公司。CCK-8检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。活性氧(ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒JC-1(5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羧花青碘化物, JC-1)均购自上海碧云天生物技术有限公司。葡萄糖提取试剂盒、乳酸提取试剂盒、糖酵解关键酶提取试剂盒及ATP提取试剂盒均购自苏州科铭生物技术有限公司。总RNA提取试剂TRIzol、qPCR预混液ChamQ SYBR Master Mix均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。BCA蛋白浓度检测试剂盒购自美国Thermo Scientific公司。增强型化学发光(ECL)试剂盒购自武汉拜意尔生物技术有限公司。细胞色素c氧化酶亚基I(cytochrome c oxidase subunit 1, COX1)抗体、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体、波形蛋白(vimentin)抗体、PI3Kp110α抗体、Akt抗体、p-Akt抗体、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)抗体、PD-L1抗体、GAPDH抗体、HRP标记山羊抗兔IgG二抗及HRP标记兔抗小鼠IgG二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司。PI3K抑制剂LY294002购自美国MedChemExpress公司。

1.3 mtDNA部分缺失细胞模型的构建

原理:经典的低浓度EB诱导法。由于无组蛋白保护,扁平状的EB分子可嵌入mtDNA双链分子碱基对之间,进而抑制mtDNA的复制与转录,同时由于EB浓度较低,细胞核DNA具有组蛋白保护,EB对细胞核DNA的结构和功能影响可以忽略。长期暴露于含有低浓度EB的培养基中,随着细胞分裂次数增加,mtDNA含量进行性下降,在细胞经历*n*代分裂后,mtDNA含量减少为原有水平的2^{-*n*}。同时由于细胞mtDNA含量明显降低,细胞存在营养代谢缺陷,需补充适量的丙酮酸钠和尿苷。

(1)选取细胞,加入预先配制好的含有EB的特殊培养基(分组为50、100、200、400 ng/mL EB,同时

含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丙酮酸钠、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尿苷)进行培养。培养 3~6 个月后,暴露于高质量浓度 EB 中的细胞已完全死亡,弃去相应培养物,将暴露在低浓度 EB 中的细胞继续培养(50、100 ng/mL EB);细胞呈单克隆样生长,继续换液培养并传代,待细胞扩增后,保种冻存,并收样检测。该细胞模型[即 mtDNA 降低细胞(mtDNA-reduced cell)]构建成功后分成等份并保存于液氮中,为了保证稳定的 mtDNA 水平,在所有的实验中都使用上述等份细胞。

(2)建立 mtDNA 恢复正常细胞模型[即恢复细胞(reverted cell)]:将上步成功构建的 mtDNA 含量下降

的细胞在不含 EB 的培养基中继续培养,直至 mtDNA 恢复至接近正常水平,得到 mtDNA 恢复细胞模型。

1.4 mtDNA 拷贝数测定

采用细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取亲本细胞(NCM460)、mtDNA 部分缺失模型细胞(mtDNA-reduced NCM460)及 mtDNA 恢复模型细胞(reverted NCM460)的 DNA。合成针对 mtDNA 特异性编码基因 ND1 及基于线粒体基因组参考序列(NC_012920)设计的特异性引物, β -actin 和 β 2 微球蛋白(beta-2-microglobulin, β 2M)分别作为核基因内参,用于 mtDNA 拷贝数的相对定量。引物序列见表 1。

表 1 ND1、NC_012920、 β -actin,以及 β 2M 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度	退火温度
ND1-F	CCCTAAAACCCGCCACATCT	69 bp	60 °C
ND1-R	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT		
β -actin-F	TGCGTTACACCCTTTCTTGA	146 bp	60 °C
β -actin-R	CACCTTCACCGTTCAGTTT		
NC_012920-F	CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC	64 bp	60 °C
NC_012920-R	GCTGGTGTAGGGTTCTTTGTTTT		
β 2M-F	GCTGGGTAGCTCTAAACAATGTATTCA	93 bp	60 °C
β 2M-R	CCATGTACTAACAATGTCTAAAATGGT		

1.5 CCK-8 实验

将 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞制成单细胞悬液,接种于 96 孔板。不同时间点从培养箱中取出 96 孔板,吸出培养液,加入稀释好的 CCK-8 溶液,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h;酶标仪测定 450 nm 处光密度(D)值。

1.6 ROS 检测

ROS 检测试剂盒中的 DCFH-DA 与无血清 DMEM 培养基按 1:1000 的比例稀释,使其终浓度为 10 μM ,将稀释好的 DCFH-DA 探针加入到收集的 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞中,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 20 min,用无血清 DMEM 培养基洗涤细胞 3 次,加入 PBS,流式细胞仪检测细胞 ROS 荧光强度,并分析数据。

1.7 线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)检测

收集适量 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞,重悬于 0.5 mL 细胞培养液中;加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,混匀后培养箱中孵育 20 min,孵育结束后,低温离心机离心,弃上清液,JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次;再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬细胞后,流式细胞仪分析检测红绿荧光比例。

1.8 细胞内葡萄糖含量检测

提取细胞内葡萄糖:将 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞收集到离心管内,按照 5×10^6 个细胞加入 1 mL 蒸馏水的比例加入蒸馏水,超声波破碎,95 °C 水浴 10 min,冷却后离心,取上清液至另一 EP 管中。样本准备:按照葡萄糖提取试剂盒说明书配制检测样品。酶标仪检测:测定各管 D_{550} 值,根据标准曲线计算葡萄糖含量。

1.9 细胞分泌乳酸检测

待测液体的获取:取适量 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞接种于六孔板,每孔加入 2 mL DMEM 完全培养基,培养箱培养,24 h 后收集培养基用于后续检测。样本的准备:按乳酸试剂提取盒说明书配制检测样品。酶标仪检测:测定各管 D_{530} 值,计算乳酸含量。

1.10 GLUT、GLUT4 mRNA 检测

使用 TRIzol 提取各组细胞(NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460)总 RNA,测定 RNA 浓度及纯度后进行逆转录。根据 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书操作,行 qPCR 检测。按每个目的基因配制 4 管计算各组分加样量,共 40 个循环。目的基因引物见表 2。

表2 GLUT1、GLUT4引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度	退火温度
GLUT1-F	TCTGGCATCAACGCTGTCTTC	94 bp	60 °C
GLUT1-R	CGATACCGGAGCCAATGGT		
GLUT4-F	ATCCTTGGACGATTCCTCATGG	90 bp	60 °C
GLUT4-R	CAGGTGAGTGGGAGCAATCT		

1.11 糖酵解关键酶活性检测

1.11.1 己糖激酶(hexokinase, HK)活性检测

细胞HK的提取(使用糖酵解关键酶提取试剂盒):收集 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460细胞到离心管内,按照 5×10^6 个细胞加入 1 mL 提取液的比例加入提取液,超声波破碎,离心,取上清液至另一 EP 管中置冰上待测。样品准备:按说明书配制检测样品。酶标仪检测:20 s 时的光密度 D_1 和 5 min 20 s 后的光密度 D_2 , 计算 HK 活性。

1.11.2 6-磷酸果糖激酶-1(6-phosphofructo-1-kinase, PFK-1)活性检测

细胞 PFK 的提取(使用糖酵解关键酶试剂提取盒):收集 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞到离心管内,按照 2×10^7 个细胞加入 1 mL 提取液的比例加入提取液,超声波破碎后, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 离心取上清液至另一 EP 管中。样品准备:按说明书配制检测样品。酶标仪检测:记录 340 nm 处 20 s 时的光密度 D_1 和 620 s 后的光密度 D_2 , 计算 PFK 活性。

1.12 细胞内 ATP 检测

细胞 ATP 提取(使用 ATP 提取试剂盒):收集 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞到离心管内,按照 5×10^6 个细胞加入 1 mL 酸性提取液的比例向细胞沉淀中加入酸性提取液,超声波破碎,离心,取上清液至另一 EP 管中,加入等体积的碱性提取液,混匀,调节 pH 至中性,再次离心,取上清液至另一 EP 管中,置冰上待测。样本准备:按照说明书配制样品。酶标仪检测:于 700 nm 处测定各管 D 值,计算 ATP 含量。

1.13 细胞侵袭力检测

24 孔板中每孔中加入稀释好的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)胶 40 μL , 置于培养箱中孵育 5 h。用无血清培养基水化基底膜。每孔加入 6×10^4 个 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞,约 200 μL 细胞悬液(无血清), Transwell 小室下室加入 700 μL 含 20% 血清培养基, 24 h 后,吸弃上室及下室培养液, PBS 缓冲液洗 2 次 Transwell 小室, 甲醇固定、结晶紫染色,用棉签轻轻擦除小室内侧未迁移细胞,显微镜下观察细胞侵袭情况。

1.14 失巢凋亡检测

polyHEMA 包被:6 孔板每孔加入 1 mL polyHEMA 溶液。将 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞接种于 polyHEMA 包被的 6 孔板,48 h 后,收集各孔悬浮细胞,锥虫蓝染色后行细胞活性检测。

1.15 EMT、PI3K/Akt/mTOR/PD-L1 通路检测

提取 NCM460、mtDNA-reduced 及 reverted NCM460 细胞总蛋白,BCA 法测量蛋白浓度, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 煮蛋白 10 min,置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。蛋白经 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭及抗体孵育(一抗均 1:1 000 稀释,二抗 1:10 000 稀释)、化学发光法检测(ECL 显色)后,采用凝胶图象处理系统分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

1.16 PI3K 抑制剂处理

1.16.1 PI3K 抑制剂对细胞内葡萄糖含量的影响

将 mtDNA-reduced NCM460 细胞接种于 6 孔板,培养过夜;将 PI3K 抑制剂 LY294002 加入上述细胞中,使其终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 30 min,以未加 LY294002 的细胞作为对照,检测细胞内葡萄糖含量。

1.16.2 PI3K 抑制剂对细胞失巢凋亡能力的影响

将 mtDNA-reduced NCM460 细胞接种于 6 孔板,培养箱中过夜;将 LY294002 加入上述细胞中,使其终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$,以不加 LY294002 的细胞为对照细胞,处理 30 min;6 孔板每孔加入 1 mL polyHEMA 铺板;将上述 LY294002 预处理细胞和未处理的细胞分别用胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,接种于 polyHEMA 包被的 6 孔板,培养 48 h,锥虫蓝染色后检测细胞活性。

1.17 统计学处理

采用软件 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 19.0 对实验结果进行统计学处理和分析,所有实验独立重复 3 次及以上,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同时标注标准误(standard error of the mean, SEM),数据统计分析采用 t 检验或方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mtDNA 编码基因在结直肠癌组织中呈低表达

采用 GEPIA 数据库分析 mtDNA 编码的部分基

因在结直肠癌和正常组织中的 mRNA 表达水平, 结果显示, 相比于正常组织, MT-ND1、MT-ND2、MT-ND3、MT-CO1 (COX1)、MT-CO2 (COX2)、MT-CO3

(COX3)、MT-ATP6 和 MT-ATP8 在结直肠癌中低表达 ($P < 0.05$), 提示 mtDNA 含量在结直肠癌中下降 (图 1)。

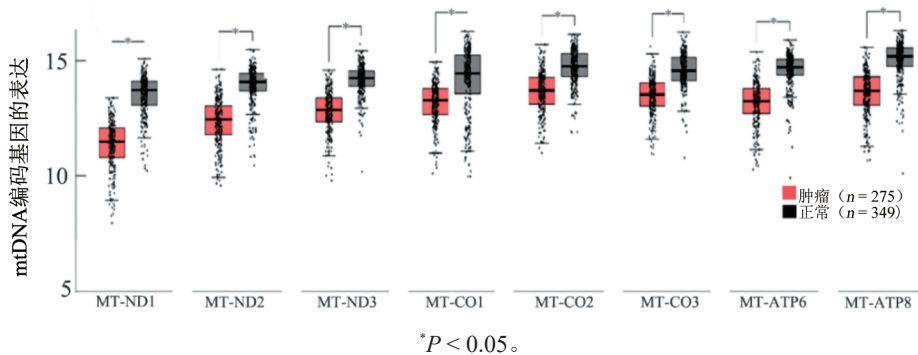


图 1 GEPIA 数据库分析 mtDNA 编码部分基因在结直肠癌和正常组织中的表达

组织芯片免疫组化分析发现, 在 42 例良性结直肠组织中 mtDNA 编码 COX1 (或 MT-CO1) 蛋白均呈高表达 (100%), 102 例结直肠癌组织中 64 例高表达

(62.7%)、38 例低表达 (37.3%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2, 分别放大 10 倍和 100 倍), mtDNA 含量下降可以导致其编码基因低表达。

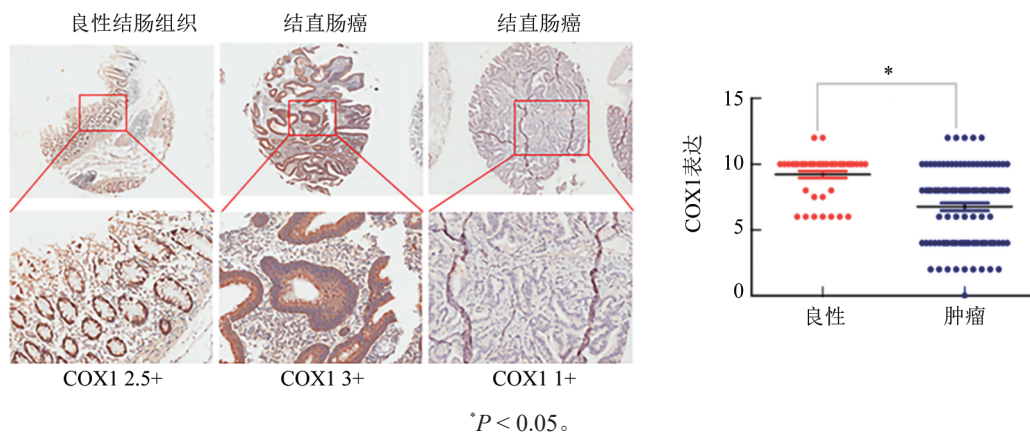


图 2 组织芯片免疫组化分析 mtDNA 编码 COX1 蛋白在结肠良性组织 ($n = 42$) 和癌组织 ($n = 102$) 中的表达 ($\times 10, \times 100$)

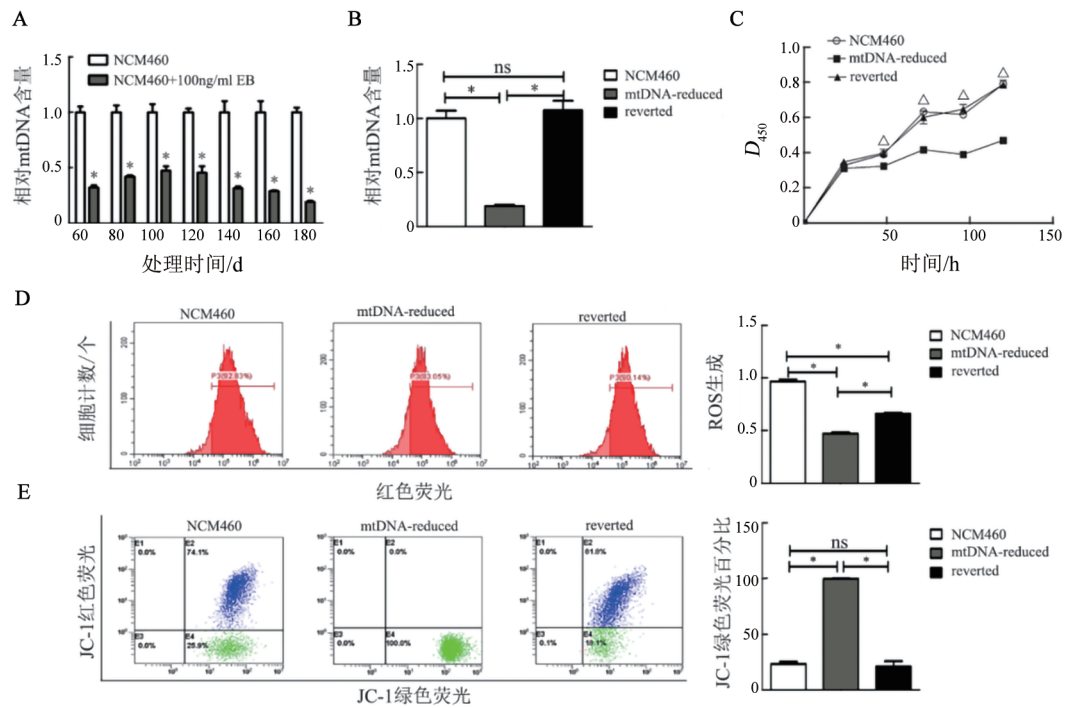
2.2 mtDNA 部分缺失细胞模型的建立及线粒体功能改变

为验证 mtDNA 部分缺失对结肠上皮细胞的影响, 首先建立 EB 诱导的 mtDNA 部分缺失细胞模型。研究发现, mtDNA 含量下降导致 NCM460 细胞线粒体功能改变 (图 3)。随着 EB 暴露时间延长, NCM460 细胞 mtDNA 含量逐渐降低 (图 3A), 经 PCR 验证, mtDNA 部分缺失细胞模型构建成功 (命名为 mtDNA-reduced NCM460)。随着 EB 撤除, mtDNA 含量逐渐恢复 (图 3B), 表明 EB 对 mtDNA 的影响具有可逆性。mtDNA 含量下降导致 NCM460 细胞生长速率明显下降 ($P < 0.05$; 图 3C), 机制待明。同时, mtDNA 含量下降导致 NCM460 细胞 ROS 生成减少 (图 3D), 细胞线粒体膜电位降低 (图 3E), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 mtDNA 含量下降诱导 NCM460 细胞发生

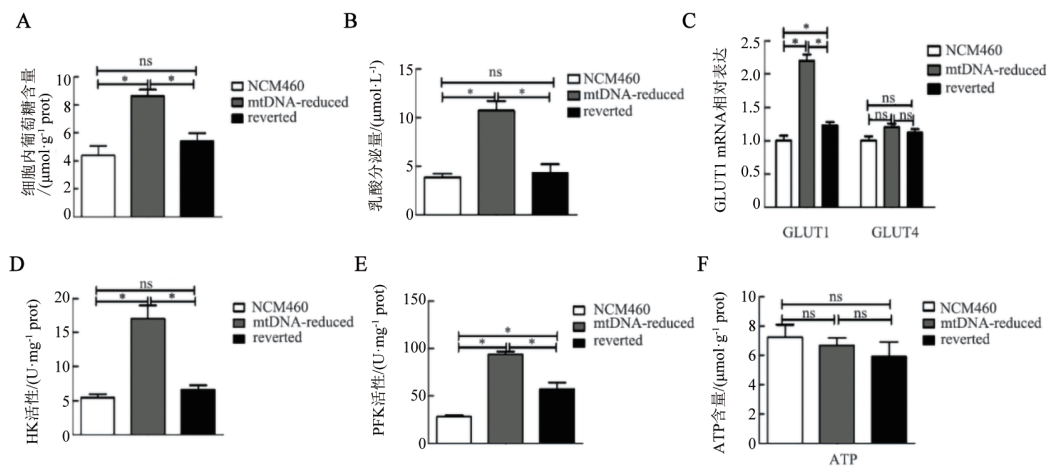
Warburg 效应并增强细胞侵袭

进一步检测 mtDNA-reduced NCM460 细胞的糖代谢表型, 结果 (图 4) 显示, mtDNA 含量下降导致 NCM460 细胞出现 Warburg 效应, mtDNA-reduced NCM460 细胞内葡萄糖含量升高 (图 4A), 细胞乳酸分泌量增加 (图 4B), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 ATP 产生无明显变化 (图 4F); qPCR 检测结果 (图 4C) 显示, mtDNA-reduced NCM460 细胞葡萄糖转运体 GLUT1 mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.05$), mtDNA-reduced NCM460 细胞糖酵解关键酶己糖激酶 (HK) 和果糖-6-磷酸激酶 (PFK) 活性增加 ($P < 0.05$; 图 4D、E)。Transwell 小室实验结果显示, mtDNA 含量下降后 NCM460 细胞侵袭能力显著增强 ($P < 0.05$; 图 5A、B)。WB 检测结果 (图 5C) 显示, mtDNA 含量下降后 NCM460 细胞 E-cadherin 表达量下降、N-cadherin 和 vimentin 表达量上升。



A: 随着EB暴露时间延长, NCM460细胞mtDNA含量逐渐降低; B: 随着EB撤除, mtDNA含量逐渐恢复; C: mtDNA-reduced NCM460细胞生长速率较reverted NCM460细胞明显下降; D: mtDNA-reduced NCM460细胞ROS生成减少; E: mtDNA-reduced NCM460细胞线粒体膜电位降低。* $P < 0.05$; ns表示差异无统计学意义。

图3 mtDNA含量下降导致线粒体功能改变



A: 细胞内葡萄糖含量增高; B: 乳酸分泌量增加; C: GLUT1 mRNA表达量增加, GLUT4表达量无变化; D: HK活性增加; E: PFK活性增加; F: ATP产生无明显变化。* $P < 0.05$, ns表示差异无统计学意义。

图4 mtDNA含量下降导致细胞出现Warburg效应

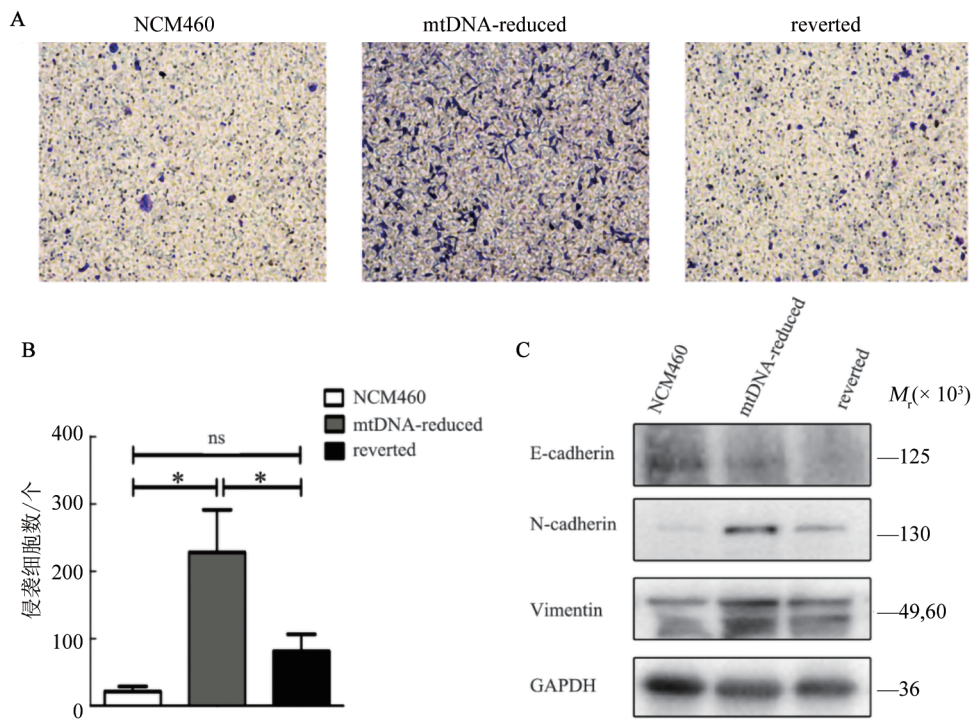
2.4 mtDNA含量下降导致NCM460细胞抵抗失巢凋亡

通过polyHEMA包被培养检测mtDNA-reduced NCM460细胞的失巢凋亡抵抗能力, 结果(图6)显示, mtDNA-reduced NCM460细胞显著抵抗失巢凋亡($P < 0.05$)。

2.5 mtDNA含量下降激活PI3K/Akt/mTOR通路并上调PD-L1表达

WB检测结果(图7)显示, mtDNA-reduced

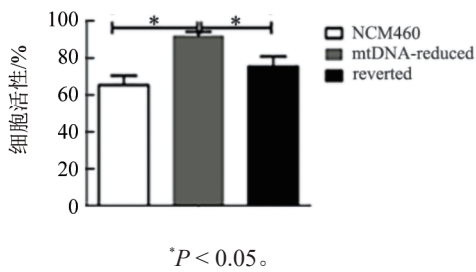
NCM460细胞中PI3K p110 α 、磷酸化Akt(p-Akt)、Akt和磷酸化mTOR(p-mTOR)蛋白表达量增加, 提示PI3K/Akt/mTOR通路激活。在mtDNA-reduced NCM460细胞中加入PI3K抑制剂LY294002后, 细胞内葡萄糖含量有降低趋势、细胞活性降低($P < 0.05$)。MtDNA含量下降导致NCM460细胞中PD-L1 mRNA水平(图8A)和蛋白水平(图8B)均增加; 加入LY294002后, mtDNA-reduced NCM460细胞PD-L1表达量有所下降(图8B)。



A: Transwell 结晶紫染色结果($\times 100$); B: 侵袭细胞数量统计; C: E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 蛋白表达。

* $P < 0.05$; ns 表示差异无统计学意义。

图5 mtDNA-reduced NCM460 细胞侵袭能力及上皮-间质转化检测



* $P < 0.05$.

图6 mtDNA 含量下降导致 NCM460 细胞抵抗失巢凋亡

3 讨论

研究发现^[9,18-19],在结直肠癌中存在 mtDNA 异常(包含 mtDNA 突变、mtDNA 拷贝数变化和 mtDNA 微卫星不稳定)。mtDNA 异常可激活线粒体-核逆向信号(retrograde signaling, RTG),通过影响核基因表达导致代谢重组、细胞表型改变及肿瘤进展^[20-25]。研究^[26]发现,前列腺上皮细胞 mtDNA 缺失可激活 PI3K/Akt2 通路,导致细胞失巢凋亡抵抗、侵袭转移及 Warburg 效应,且该过程可逆。提示 PI3K/Akt 通路可能是 mtDNA 异常致癌的关键介质。既往研究表明 PI3K/Akt/mTOR 通路上调可促进 PD-L1 表达,导致肿瘤免疫逃逸^[27-28]。

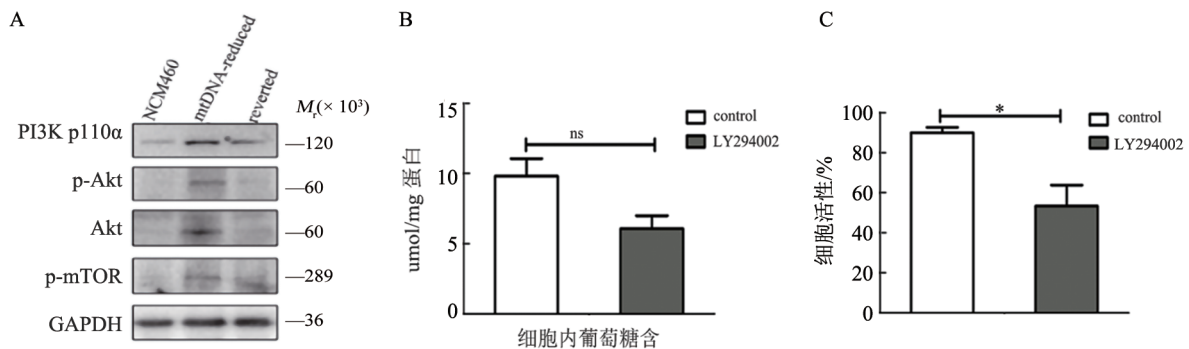
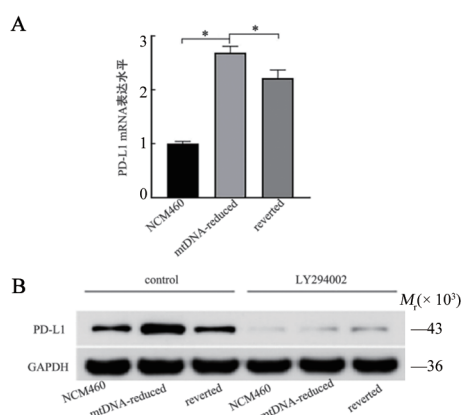


图7 mtDNA 含量下降激活 PI3K/Akt/mTOR 通路



A:PD-L1 mRNA 水平变化;B:PD-L1 蛋白水平变化及 LY294002 抑制效果。(以不加 LY294002 的细胞作为对照)。

* $P < 0.05$ 。

图8 mtDNA 含量下降上调 NCM460 细胞 PD-L1 表达

本实验中,GEPIA 数据库分析显示 mtDNA 编码基因在结直肠癌中低表达;组织芯片免疫组化分析显示 mtDNA 编码 COX1 蛋白在良性结肠组织高表达,在结肠癌组织中低表达,这些都表明结直肠癌中存在 mtDNA 部分缺失,因此,本研究构建结肠上皮细胞 NCM460 细胞 mtDNA 部分缺失模型。实验发现,mtDNA 部分缺失后模型细胞线粒体功能改变、出现 Warburg 效应和乳酸产生增加,这些导致高酸性微环境。研究认为肿瘤微环境酸化通过抑制 T 细胞增殖、影响中性粒细胞和树突状细胞的趋化性和迁移、增加调节性 T 细胞(Treg)以及促进髓源性抑制细胞和 M2 巨噬细胞的浸润,从而抑制免疫^[29-30]。同时,mtDNA 部分缺失后 NCM460 细胞侵袭能力增强且发生上皮间质转化,同时抵抗失巢凋亡,这些都是上皮细胞恶化的标志,上述结果表明 mtDNA 部分缺失诱导 NCM460 细胞恶性转化。进一步发现,mtDNA 部分缺失后 NCM460 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路被激活,PD-L1 表达增加,而 PD-L1 表达增加可以导致结肠肿瘤细胞发生免疫逃逸。加入 PI3K 抑制剂 LY294002 或 mtDNA 恢复后,模型细胞内葡萄糖含量降低,不再抵抗失巢凋亡,PD-L1 表达下降。提示 mtDNA 部分缺失可能通过 PI3K/Akt/mTOR/PD-L1 轴诱导结肠上皮细胞恶性转化及免疫逃逸。接下来,将 mtDNA 部分缺失细胞 NCM460 细胞与 CD3/CD28 刺激的 T 细胞共培养,流式检测 T 细胞凋亡和增殖能力;同时,mtDNA 部分缺失细胞模型与 IL-13R α 2 特异性 T 细胞共培养,流式细胞仪检测模型细胞 caspase-6 激活情况,以此来评估 T 淋巴细胞毒性。

本研究揭示了 mtDNA 缺失通过 PI3K/Akt/mTOR/PD-L1 轴促进结肠上皮细胞恶性转化的新机制。本研究局限性在于仅使用单一细胞系,后续

将在其他结直肠上皮细胞系(如 FHC、CCD 841CoN)中验证。后续拟通过转录组学、磷酸化蛋白组学及全蛋白组学寻找差异基因,进一步探讨 mtDNA 异常可能激活的具体线粒体-核逆向信号通路同时开展挽救实验;后续将通过动物实验验证 mtDNA 缺失细胞的成瘤能力及免疫逃逸表型,并收集临床标本分析 mtDNA 含量与患者预后的相关性。未来本课题组希望找出 mtDNA 缺失激活的线粒体-核逆向信号通路中的多个关键环节分子,它们有望成为全新的个体化预警和干预靶点,为伴有 mtDNA 缺失的结直肠癌患者个体化治疗提供新靶点。

[利益冲突声明] 所有作者均声明无任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53. DOI:10.1016/j.jncc.2024.01.006.
- [2] UNDERWOOD P W, RUFF S M, PAWLIK T M. Update on targeted therapy and immunotherapy for metastatic colorectal cancer[J]. Cells, 2024, 13(3): 245. DOI:10.3390/cells13030245.
- [3] BILLER L H, SCHRAG D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review[J]. Jama, 2021, 325(7): 669. DOI: 10.1001/jama.2021.0106.
- [4] AN J S, NAM C H, KIM R, et al. Mitochondrial DNA mosaicism in normal human somatic cells[J]. Nat Genet, 2024, 56(8): 1665-1677. DOI:10.1038/s41588-024-01838-z.
- [5] WU Z, SAINZ A G, SHADEL G S. Mitochondrial DNA: cellular genotoxic stress sentinel[J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(10): 812-821. DOI:10.1016/j.tibs.2021.05.004.
- [6] SANCHEZ-CONTRERAS M, SWEETWYNE M T, TSANTILAS K A, et al. The multi-tissue landscape of somatic mtDNA mutations indicates tissue-specific accumulation and removal in aging[J]. eLife, 2023, 12: e83395. DOI:10.7554/eLife.83395.
- [7] HAHN A, HUNG G C C, AHIER A, et al. Misregulation of mitochondrial 6mA promotes the propagation of mutant mtDNA and causes aging in *C. elegans*[J]. Cell Metab, 2024, 36(12): 2528-2541.e11. DOI:10.1016/j.cmet.2024.07.020.
- [8] LEE H C, YIN P H, LIN J C, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1042: 109-122. DOI:10.1196/annals.1338.011.
- [9] CUI H H, HUANG P, WANG Z J, et al. Association of decreased mitochondrial DNA content with the progression of colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 110. DOI:10.1186/1471-2407-13-110.
- [10] DE ARAUJO L F, FONSECA A S, MUYS B R, et al. Mitochondrial genome instability in colorectal adenoma and adenocarcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(11): 8869-8879. DOI: 10.1007/s13277-015-3640-7.
- [11] YANG K M, LI X, FORMAN M R, et al. Pre-diagnostic leukocyte mitochondrial DNA copy number and colorectal cancer risk[J]. Carcinogenesis, 2019, 40(12): 1462-1468. DOI: 10.1093/carcin/bgz159.

- [12] VAN OSCH F H M, VOETS A M, SCHOUTEN L J, et al. Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(12): 1502-1510. DOI:10.1093/carcin/bgv151.
- [13] LIN P C, LIN J K, YANG S H, et al. Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an *in vitro* study[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(12): 1223-1232. DOI:10.1007/s00384-008-0539-4.
- [14] NUNES L, LI F Q, WU M Z, et al. Prognostic genome and transcriptome signatures in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2024, 633(8028): 137-146. DOI:10.1038/s41586-024-07769-3.
- [15] CHEN T, HE J, SHEN L J, et al. The mitochondrial DNA 4, 977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer[J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 8. DOI:10.1186/1471-2350-12-8.
- [16] CHANG S C, LIN P C, YANG S H, et al. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2009, 24(6): 623-628. DOI: 10.1007/s00384-009-0663-9.
- [17] USSAKLI C H, EBAEE A, BINKLEY J, et al. Mitochondria and tumor progression in ulcerative colitis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(16): 1239-1248. DOI:10.1093/jnci/djt167.
- [18] WANG C J, ZHAO S N, DU Y M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA is associated with colorectal cancer outcome[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27(6): 4361-4363. DOI: 10.3109/19401736.2015.1089502.
- [19] MIWATA T, HIYAMA T, QUACH D T, et al. Differences in K-ras and mitochondrial DNA mutations and microsatellite instability between colorectal cancers of Vietnamese and Japanese patients[J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 203. DOI:10.1186/s12876-014-0203-0.
- [20] DASGUPTA N, LEI X, SHI C H, et al. Histone chaperone HIRA, promyelocytic leukemia protein, and p62/SQSTM1 coordinate to regulate inflammation during cell senescence[J]. *Mol Cell*, 2024, 84(17): 3271-3287, e8. DOI:10.1016/j.molcel.2024.08.006.
- [21] WANG S F, TSENG L M, LEE H C. Role of mitochondrial alterations in human cancer progression and cancer immunity[J]. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1): 61. DOI:10.1186/s12929-023-00956-w.
- [22] BUI T H D, LABEDZKA-DMOCH K. RetroGREAT signaling: The lessons we learn from yeast[J]. *IUBMB Life*, 2024, 76(1): 26-37. DOI:10.1002/iub.2775.
- [23] CUI D Q, LIU H X, CAO L L, et al. MST1, a novel therapeutic target for Alzheimer's disease, regulates mitochondrial homeostasis by mediating mitochondrial DNA transcription and the PI3K-Akt-ROS pathway[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1056. DOI: 10.1186/s12967-024-05852-x.
- [24] DISSMEYER N. Oxygen sensing: Protein degradation meets retrograde signaling[J]. *Curr Biol*, 2022, 32(6): R281-R284. DOI: 10.1016/j.cub.2022.02.047.
- [25] WEITH M, GROßBACH J, CLEMENT-ZIZA M, et al. Genetic effects on molecular network states explain complex traits[J]. *Mol Syst Biol*, 2023, 19(8): e11493. DOI:10.15252/msb.202211493.
- [26] MORO L, ARBINI A A, YAO J L, et al. Mitochondrial DNA depletion in prostate epithelial cells promotes anoikis resistance and invasion through activation of PI3K/Akt2[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(4): 571-583. DOI:10.1038/cdd.2008.178.
- [27] PARSA A T, WALDRON J S, PANNER A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma[J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 84-88. DOI: 10.1038/nm1517.
- [28] LASTWIKA K J, WILSON W 3rd, LI Q K, et al. Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(2): 227-238. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-3362.
- [29] IPPOLITO L, MORANDI A, GIANNONI E, et al. Lactate: a metabolic driver in the tumour landscape[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(2): 153-166. DOI:10.1016/j.tibs.2018.10.011.

[收稿日期] 2025-08-30

[修回日期] 2026-01-29

[本文编辑] 黄静怡