

# 下调线粒体转录因子A对肺腺癌细胞A549成瘤能力和药物敏感性的影响

伍潇怡<sup>1</sup> 卢圆圆<sup>1</sup> 胡轲轲<sup>1</sup> 蓝林华<sup>1</sup> 谢德耀<sup>2</sup> 刘永章<sup>1</sup> 吕斌<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>温州医科大学检验医学院、生命科学学院,浙江省医学遗传学重点实验室,温州 325035;

<sup>2</sup>温州医科大学附属第一医院心胸外科,温州 325000)

**摘要** 该文初步探讨了下调线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)对人肺腺癌细胞A549的影响。该研究将靶向TFAM基因的shRNA慢病毒载体感染A549细胞,应用蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测TFAM蛋白质水平,划痕愈合实验检测细胞迁移能力,裸鼠成瘤实验检测细胞体内增殖能力,CCK-8实验和Western blot检测细胞毒性及细胞对药物敏感性。结果显示,该研究成功地在A549细胞中下调了TFAM蛋白质水平,TFAM敲低的细胞形态发生改变,愈合能力明显减弱,裸鼠成瘤能力减弱,裸鼠成瘤的体积和体重均具有显著差异,细胞毒性增强,且细胞对阿霉素的敏感性增强。结果表明,下调TFAM可影响细胞迁移能力和体内增殖能力,通过增加细胞凋亡提高肿瘤细胞对抗肿瘤药物阿霉素的敏感性,提示TFAM可作为肺腺癌治疗的潜在靶点。

**关键词** 线粒体转录因子A; A549细胞; 细胞迁移; 肿瘤形成; 药物敏感性

## Down-regulation of Mitochondrial Transcription Factor A Inhibits Tumorigenesis and Enhances Chemosensitivity of Lung Adenocarcinoma A549 Cells

Wu Xiaoyi<sup>1</sup>, Lu Yuanyuan<sup>1</sup>, Hu Keke<sup>1</sup>, Lan Linhua<sup>1</sup>, Xie Deyao<sup>2</sup>, Liu Yongzhang<sup>1</sup>, Lü Bin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics,

Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; <sup>2</sup>Department of Cardiothoracic Surgery,

the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effect of down-regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) on lung adenocarcinoma cell line A549. A549 cells were infected with control or TFAM-shRNA lentiviral particles and the down-regulation of TFAM was confirmed by Western blot. Wound healing assay, nude mice tumorigenesis test, CCK-8 assay were carried out to examine the ability of cell migration, tumorigenesis in nude mice and cell viability of A549 cells, respectively. Our results showed that TFAM protein was significantly reduced by TFAM-shRNA plasmids. Compared with the control group, TFAM depletion cells showed a morphology change and a significant decrease in migration ability. In addition, down-regulation of TFAM led to decreased tumorigenesis of A549 cell in nude mice. Furthermore, down-regulation of TFAM enhanced cell cytotoxicity and apoptosis after treating A549 cells with a gradient doxorubicin. Taken together, our findings demonstrated that

收稿日期: 2016-01-04 接受日期: 2016-02-04

国家自然科学基金(批准号: 31070710、31171345、31570772)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

Received: January 4, 2016 Accepted: February 4, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31070710, 31171345, 31570772)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-04-07 14:46:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160407.1446.004.html>

down-regulation of TFAM inhibited tumorigenesis and enhanced chemosensitivity of A549 cells, indicating that TFAM might serve as a potential target in the treatment of human lung adenocarcinoma.

**Keywords** mitochondrial transcription factor A; A549; cell migration; tumorigenesis; chemosensitivity

肺癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤之一。近年来,我国肺癌的发病率呈逐年上升态势而且非小细胞肺癌的发生率占据了肺癌发生率的80%左右,且患者5年生存率低于10%,因此,研究与非小细胞肺癌发生及发展相关的蛋白质,对肺癌的诊断、治疗及预防具有非常重要的意义<sup>[1]</sup>。线粒体是真核细胞进行有氧呼吸的主要场所,正常氧供应下,它利用氧化磷酸化为细胞生命活动提供90%以上的能量,并且与年龄相关的多种疾病以及癌症都与线粒体功能损伤息息相关<sup>[2]</sup>。而作为高速泳动蛋白家族(high mobility group, HMG)成员的线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM),是线粒体内最重要的转录因子之一,负责D-loop区起始转录线粒体基因组。有研究表明,TFAM蛋白质对于维持线粒体完整性及正常功能起着十分重要的作用<sup>[3]</sup>。据报道,TFAM蛋白质在多种组织中高表达,如膀胱癌等<sup>[4]</sup>,然而TFAM蛋白质与非小细胞肺癌发生发展的相关性至今未见报道。本研究拟通过慢病毒转染技术沉默TFAM基因,探索该基因沉默后对非小细胞肺癌细胞A549的某些肿瘤特性的影响,旨在为寻找诊断或治疗肺癌的有效靶点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和抗体

RPMI 1640、DMEM培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自Life Technologies公司。嘌呤霉素(puromycin)购自Amresco公司。BCA蛋白质定量试剂盒和ECL化学发光试剂盒均购自Thermo Fisher公司。蛋白marker和硝酸纤维素膜均购于Bio-Rad公司。CCK-8(Cell Counting Kit-8)检测试剂盒、胰蛋白酶消化液、青霉素/链霉素、阿霉素(doxorubicin)、山羊抗兔IgG二抗和山羊抗鼠IgG二抗均购自上海碧云天生物技术有限公司。单克隆抗体 $\beta$ -actin购自上海Abmart公司,多克隆抗体TFAM购自Abcam公司,多克隆抗体PARP、Caspase 3和Cleaved Caspase 3购自Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 细胞系和细胞培养

非小细胞肺癌A549细胞系和293T细胞系均购

自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库。A549细胞用含10% FBS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100  $\mu$ g/mL)的RPMI 1640培养基于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,293T细胞则用含10% FBS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100  $\mu$ g/mL)的DMEM培养基于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

### 1.3 慢病毒包装及细胞感染

携带有靶向基因TFAM的shRNA慢病毒载体(TFAM-shRNA)和其阴性对照慢病毒载体(TFAM-NC)均由南京巴傲得公司合成,TFAM-shRNA靶向序列为:5'-CCG GGG GAA CTT CCT GAT TCA AAG ACT CGA GTC TTT GAA TCA GGA AGT TCC CTT TTT G-3'(正向引物)、3'-AAT TCA AAA AGG GAA CTT CCT GAT TCA AAG ACT CGA GTC TTT AAT CAG GAA GTT CCC-5'(反向引物)。而后,我们使用GeneCopoeia公司的慢病毒包装试剂盒按照说明书指示,用293T细胞对病毒载体进行包装,最后得到包装完整的含TFAM靶向基因的完整病毒及其阴性对照的病毒。

感染A549细胞时,先将A549细胞接种于24孔板,每孔大约 $6 \times 10^4$ 细胞,用含10% FBS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100  $\mu$ g/mL)的RPMI 1640完全培养基于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。第2 d弃去旧培养基,更换新培养基,分别加入含靶向基因的病毒和其阴性对照病毒,使其病毒终浓度为6  $\mu$ g/mL,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。第3 d弃去旧培养基,将细胞转移至小皿,再用RPMI 1640完全培养基于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养48 h,然后加入嘌呤霉素(1  $\mu$ g/mL)筛选稳转细胞系。一般加入嘌呤霉素14 d后即可得到TFAM-shRNA和TFAM-NC稳定表达的A549细胞(分别命名为A549 shTFAM和A549 shNC细胞)。

### 1.4 细胞总蛋白测定和蛋白质印迹

细胞用RIPA裂解液(已加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂)在冰上裂解20 min,然后13 000 r/min于4  $^{\circ}$ C离心30 min,收集上清液,用BCA蛋白质检测试剂盒检测蛋白质浓度。取20  $\mu$ g蛋白质进行10% SDS-PAGE蛋白质电泳,然后将所分离的蛋白质湿转到硝酸纤

纤维素膜上,并用5%的脱脂牛奶封闭1.5 h;于4 °C孵育一抗过夜,一抗分别为:β-actin(1:2 000);TFAM、Caspase 3、Cleaved Caspase 3和PARP均按1:1 000稀释;第2 d,用1×TBST洗膜,在摇床上室温孵育二抗1 h,二抗分别为:β-actin为鼠抗(1:3 000),TFAM为兔抗(1:20 000),Caspase 3、Cleaved Caspase 3和PARP均为兔抗(1:2 000);然后用1×TBST洗膜3次以上,每次10 min;加入ECL化学发光试剂,用X-光胶片显影;最后以β-actin为参照,蛋白质条带用Image J软件进行定量统计分析。

### 1.5 细胞划痕愈合实验

将A549 shNC和A549 shTFAM细胞分别接种于6孔板上,待细胞全部长满后,用小号无菌移液器头划痕,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)将掉落的细胞洗净后加入含1% FBS的RPMI 1640培养基,在倒置显微镜下观察并记录0 h的划痕宽度,将细胞放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养,分别在6、12、24和36 h用倒置显微镜观察相同位置并记录其愈合程度。

### 1.6 裸鼠成瘤实验

用15 cm细胞培养皿培养足够的A549 shNC和A549 shTFAM细胞,胰蛋白酶消化收集后用无血清RPMI 1640培养基将细胞数调节到 $6 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液。然后在5周的雌性裸鼠肩胛骨两侧皮下分别注射100 μL细胞,左侧为A549 shNC细胞,右侧为A549 shTFAM细胞。将裸鼠培养在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房中,观察裸鼠表皮肿瘤生长情况。待肿瘤长出后每隔1 d测量肿瘤体积,并在24 d后用CO<sub>2</sub>吸入法安乐死,将肿瘤剥离并称重。本课题裸鼠成瘤实验获得了温州医科大学实验动物管理和伦理委员会批准。

### 1.7 药物敏感性实验

为了检测A549细胞中TFAM蛋白质水平对阿霉素敏感性的影响,我们将A549 shNC和A549 shTFAM细胞分别接种于6孔板上,然后放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,第2 d加入浓度梯度的阿霉素进行处理,浓度梯度为:0、1、2、4、8、16 μg/mL,培养24 h后收集细胞,用BCA法测蛋白质浓度后,用10% SDS-PAGE进行蛋白质电泳,并观察Cleaved PARP和Cleaved Caspase 3蛋白质水平。

### 1.8 药物毒性检测

将A549 shNC和A549 shTFAM细胞以密度为

$5 \times 10^3$ /孔分别接种于96孔板上,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,第2 d换上浓度梯度为0、2、4、8、16 μg/mL的阿霉素,培养24 h后加入CCK-8检测试剂,继续培养2 h后检测450 nm处的吸光度值。

### 1.9 统计学方法

所有试验均独立重复3次,所有统计分析均使用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5进行统计分析。数据统计以mean±S.D.表示,两个样本之间的均数比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示两样本之间差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TFAM-shRNA慢病毒感染A549细胞及蛋白的表达

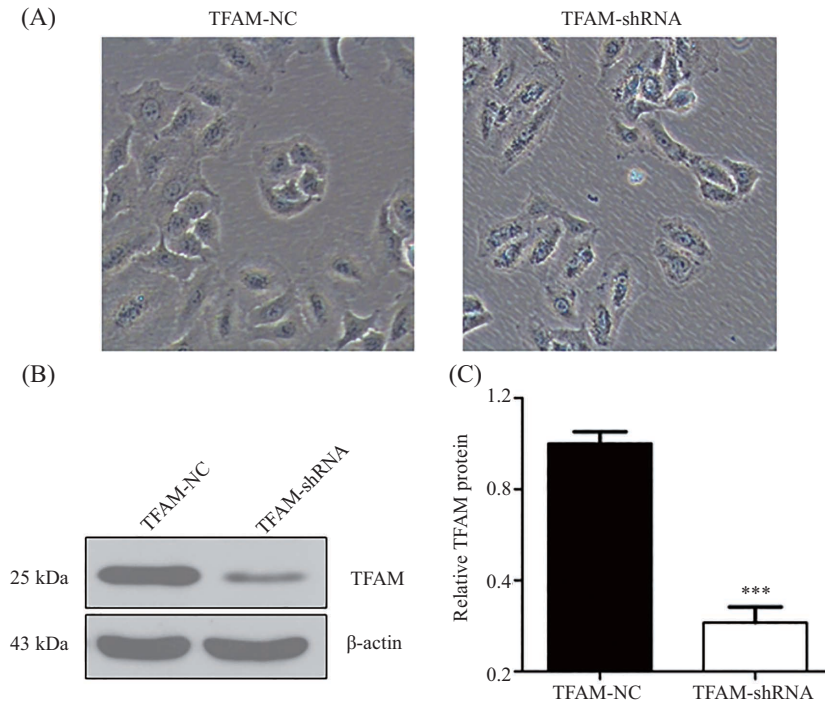
用TFAM-shRNA和其阴性对照病毒载体分别感染A549细胞,然后用嘌呤霉素筛选2周后在显微镜下观察细胞形态变化(图1A)。结果显示,相对于阴性对照组,TFAM-shRNA病毒感染的细胞(A549 shTFAM)状态明显较阴性对照差,细胞轮廓不清,部分细胞出现胞质浓缩,细胞核边缘模糊不清楚,核固缩,细胞体积变小,表明细胞趋于凋亡状态。之后,我们收集细胞,用Western blot方法对A549细胞中的TFAM蛋白质进行分析(图1B)。结果显示,相对于阴性对照组,A549 shTFAM细胞中TFAM蛋白质水平明显下调,且具有统计学意义(图1C)。

### 2.2 TFAM下调抑制A549细胞迁移能力

为了进一步明确TFAM下调对A549细胞迁移能力的影响,我们进行了细胞划痕实验,分别观察了6、12、24和36 h时A549细胞的愈合能力。结果表明,与阴性对照组相比,TFAM下调后A549细胞的愈合能力明显减弱(图2A),测量其迁移率后,用GraphPad Prism 5进行数据统计分析后发现,在划痕6 h后,TFAM下调的A549细胞相较于阴性对照愈合能力下降,但无统计学意义;在12 h以后均表现出具有统计学意义的明显差异(图2B)。

### 2.3 TFAM下调抑制A549细胞的体内成瘤能力

将 $6 \times 10^6$  A549 shNC和A549 shTFAM细胞分别注射入雌性裸鼠肩胛骨两侧表皮下方,10 d后肿瘤长出,之后每隔1 d监测肿瘤的体积。结果显示,相对于阴性对照组,注射shTFAM A549细胞组的裸鼠肿瘤体积明显要比注射对照组小, $P < 0.05$ (图3A)。24 d后将裸鼠拍照记录(图3B),然后处死裸鼠,将瘤体从裸鼠体内剥离并称重,结果显示,TFAM敲低组

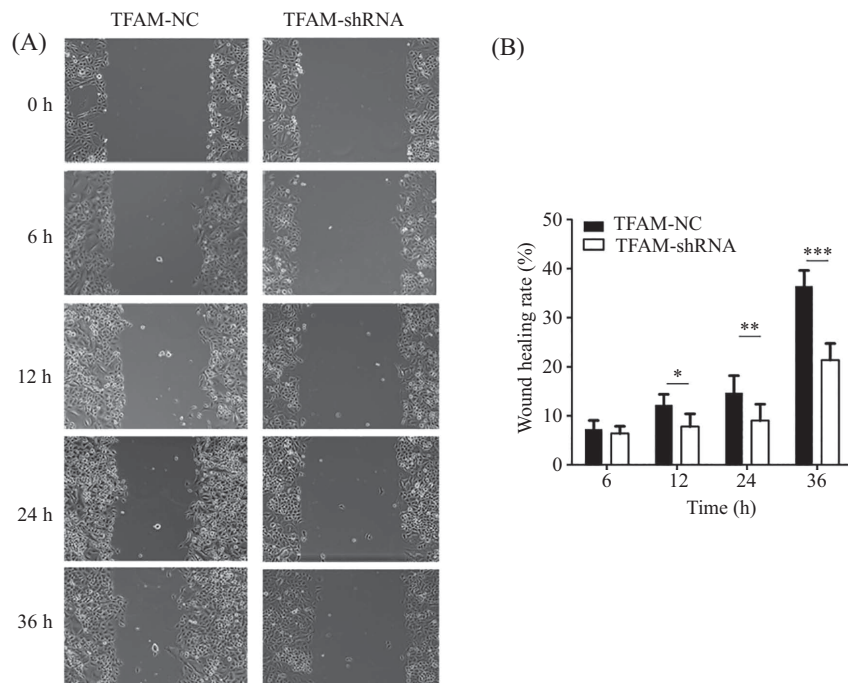


A: 普通倒置显微镜下观察TFAM敲低后A549细胞形态变化(400×); B、C: 蛋白印迹法检测A549 shNC和A549 shTFAM细胞中TFAM蛋白质水平。数值以均值±标准误差表示, \*\*\* $P < 0.001$ , 与TFAM-NC组相比。

A: the effect of TFAM-shRNA on morphology of A549 cells was observed under regular inverted microscope (400×); B,C: TFAM protein level in A549 cells detected by Western blot analysis. Data were presented as mean±S.D.. \*\*\* $P < 0.001$  compared with TFAM-NC group.

图1 蛋白免疫印迹法验证A549 shTFAM细胞中TFAM蛋白质水平的下调

Fig.1 The down-regulation of TFAM protein level in A549 shTFAM was confirmed by Western blot analysis

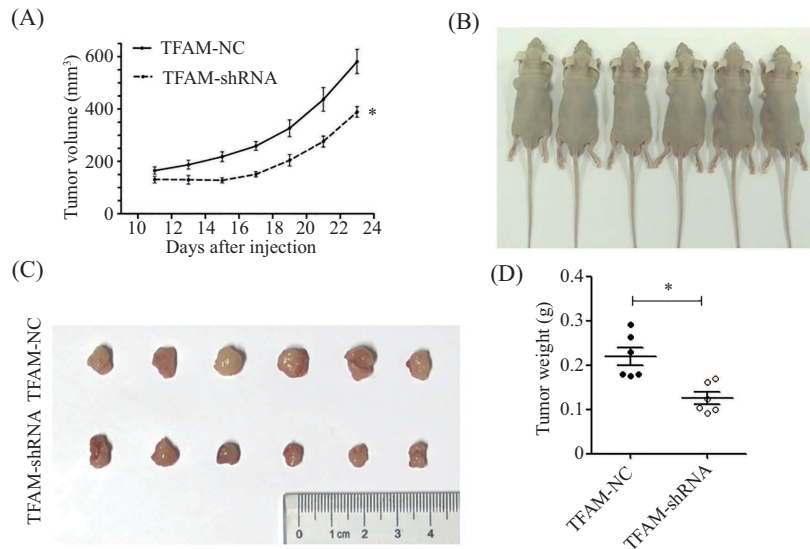


A: 普通倒置显微镜下观察划痕愈合实验中TFAM下调A549细胞的迁移能力(100×, 此为其中1次实验的图( $n=3$ ); B: 对A实验进行统计分析, 数值以均值±标准误差表示, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: migration ability in TFAM down-regulated A549 cells compared with control, detected by wound healing assay (100×,  $n=3$ ); B: statistical analysis of A, data were presented as mean±S.D.. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图2 下调TFAM对A549细胞迁移能力的影响

Fig.2 The effect of TFAM down-regulation on migration ability of A549 cells

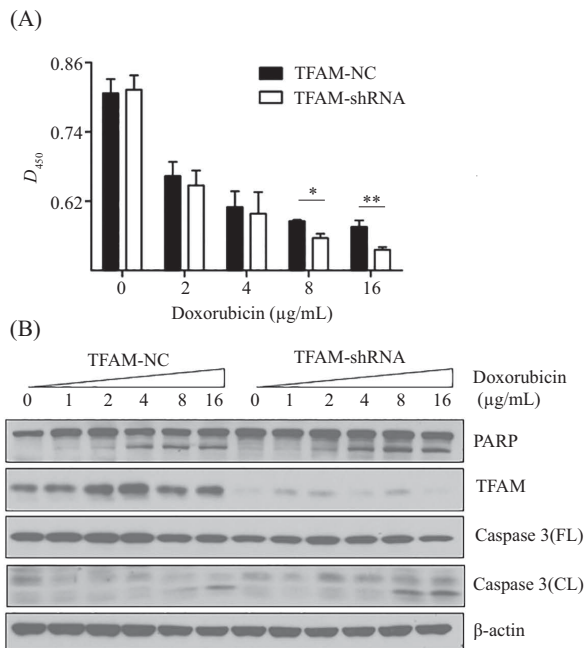


A: 实时监测TFAM敲低及对照组裸鼠的肿瘤体积; B、C: 注射后24 d肿瘤的实体图; D: TFAM敲低组和对照组裸鼠肿瘤质量的统计图, 数值以均值±标准误差表示( $n=5$ )。\* $P<0.05$ , 与TFAM-NC组相比。

A: monitoring the tumor volume in nude mice injected with A549 shNC or A549 shTFAM cells; B,C: tumor entity graph after injected for 24 d; D: the statistical chart of tumor weight of nude mice injected with A549 shNC or A549 shTFAM cells, data were presented as mean±S.D. ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  compared with TFAM-NC group.

图3 下调TFAM对A549细胞体内成瘤能力的影响

Fig.3 The effect of TFAM down-regulation on A549 cell tumorigenesis in nude mice



A: 用CCK-8法检测阿霉素对TFAM下调后A549细胞的毒性( $n=3$ ); B: Western blot分析结果显示, 与对照组相比, 阿霉素处理后的TFAM下调A549细胞呈现出更多的PARP和Caspase 3蛋白质切割。数值以均值±标准误差表示( $n=3$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

A: cytotoxicity of doxorubicin in TFAM depletion A549 cells which was analyzed with CCK-8 assay; B: TFAM down-regulated A549 cells exhibited more cleavage of PARP and Caspase 3 compared with control cells after treatment with doxorubicin. Data were presented as mean±S.D. ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图4 TFAM下调对A549细胞药物敏感性的影响  
Fig.4 The effect of TFAM down-regulation on chemosensitivity in A549 cells

的肿瘤质量明显低于阴性对照组(图3C和图3D)。

#### 2.4 TFAM下调提高A549细胞对阿霉素的敏感性

为了进一步了解TFAM与临床抗肿瘤药物的相关性, 我们使用较常见的临床抗肿瘤药物阿霉素分别对TFAM下调和阴性对照组的A549细胞进行处理, 阿霉素浓度呈梯度增加, 而后用CCK-8检测(图4A)。结果表明, 相对于阴性对照组, TFAM下调后A549细胞对阿霉素的敏感性增强。为了更深入地了解其机制, 我们在阿霉素处理后, 用10% SDS-PAGE进行蛋白质分离, 检测凋亡相关蛋白PARP及Caspase 3的蛋白质水平变化。结果表明, 相对于阴性对照组, TFAM下调后的A549细胞中, PARP和Caspase 3的切割都明显增加, 且呈浓度依赖性(图4B)。

### 3 讨论

肺癌可根据细胞类型分为小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)两类, 而且NSCLC发生率占据了肺癌发生率的80%左右。尽管近年来对NSCLC早期诊断、筛查以及新的治疗方案都有一定的改进, 但所有阶段的NSCLC的预后依然很差: 5年生存率仍然不到15%, 而且大都由于癌症的转移和复发引起。因此, 寻找NSCLC肿瘤发生分子机制的新型生

物标志物具有重要意义<sup>[5]</sup>。

Warburg用细胞能量代谢方式阐释了肿瘤细胞的形成。他认为,肿瘤细胞来源于正常细胞,分两个阶段形成。第一阶段是由于多种原因引起的呼吸链不可逆损伤,即氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)功能损伤;第二阶段,一部分细胞因为缺少能量供应而死亡,而有一部分细胞则依赖产能较快的糖酵解(aerobic glycolysis)供能存活下来,以满足肿瘤细胞快速生长需要,因此形成肿瘤<sup>[6]</sup>。而近几年的研究表明,线粒体OXPHOS的不可逆损伤不一定是引起肿瘤的主要原因,在特定细胞里抑制糖酵解可以恢复线粒体的OXPHOS功能<sup>[7-8]</sup>。线粒体的其他功能缺失也可能是引起肿瘤的原因之一,例如,线粒体基因组突变或缺失、线粒体融合分裂失衡、与线粒体基因组相关酶类缺失或突变等因素<sup>[9-10]</sup>。线粒基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)是独立于细胞核外的基因组,具有自我复制、转录、编码功能,线粒体编码的13种亚基和核基因编码亚基共同组成氧化磷酸化复合物体系<sup>[11]</sup>。TFAM是最早发现的线粒体转录因子,作为高速泳动家族之一,在mtDNA复制过程中起重要作用。线粒体DNA拷贝数直接受TFAM蛋白质水平的影响,TFAM增加将引起线粒体DNA拷贝数增加<sup>[12-14]</sup>。有研究发现,对比癌旁组织,膀胱癌组织TFAM蛋白质水平明显升高<sup>[15]</sup>,提示TFAM与肿瘤生长有一定相关性。而Han等<sup>[3]</sup>报道,在前列腺癌细胞中TFAM过表达后细胞增殖加快,而小干扰RNA沉默TFAM蛋白质的细胞通过p21介导的细胞周期G<sub>1</sub>期的阻滞抑制了细胞增殖。为进一步阐释TFAM蛋白质可作为肿瘤发生、发展的标志物,本研究探讨了敲低TFAM对肺腺癌细胞A549伤口愈合能力、体内增殖能力即裸鼠成瘤能力以及对药物敏感性的影响。

本研究表明,利用靶向TFAM基因的shRNA慢病毒载体感染细胞可明显抑制A549细胞中TFAM蛋白质水平,TFAM下调的A549细胞愈合能力明显减弱,与Lin等<sup>[6]</sup>在食管癌的研究结果相符。同时,我们将下调TFAM的A549细胞及其阴性对照细胞注射入5周龄雌性裸鼠皮下,研究TFAM蛋白质水平降低对裸鼠皮下成瘤能力的影响。结果发现,下调TFAM抑制了A549细胞在裸鼠皮下成瘤的能力,肿瘤生长明显受到抑制。以上实验结果结合文献报道提示,TFAM下调可抑制肿瘤细胞生长,上调可促

进肿瘤细胞生长,与Guo等<sup>[11]</sup>在散发性结直肠癌的研究结果相符。肿瘤的发生、发展与多种因素相关,如肿瘤细胞的生长、转移以及血管生成、凋亡等,那么下调TFAM蛋白是否会影响肿瘤细胞的凋亡呢?阿霉素是一种广谱抗肿瘤药物,适用于急性白血病等多种恶性肿瘤,也可用于肺癌的联合治疗,但在临床应用中常会引起心肌损伤,进而产生心脏毒性<sup>[17-18]</sup>。本研究用浓度梯度的阿霉素处理细胞24 h,观察到下调TFAM的细胞凋亡产生了浓度依赖性的增加,PARP和Caspase 3切割相应增加,进而使细胞对阿霉素更加敏感。因此,同等用量阿霉素既能使TFAM下调的肿瘤细胞凋亡增加又能相对减少心脏毒性<sup>[19-20]</sup>。细胞毒性实验进一步表明,在下调TFAM蛋白质前提下,阿霉素将对肺腺癌细胞产生更大的细胞毒性,而使细胞更易发生凋亡。综上所述,TFAM下调使细胞迁移能力和成瘤能力减弱,且使细胞对药物的敏感性增加。因此,TFAM蛋白质可作为诊断和治疗肺腺癌的潜在的有效标志物和靶点。

### 参考文献 (References)

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- 2 Balliet RM, Capparelli C, Guido C, Pestell TG, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, *et al*. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth understanding the aging and cancer connection. *Cell Cycle* 2011; 10(23): 4065-73.
- 3 Bin H, Hiroto I, Yoshihiro Y, Masaki A, Takahiro Y, Naohiro F, *et al*. Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 408: 45-51.
- 4 Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, *et al*. Mitochondrial and energy metabolism related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer* 2011; 129(4): 820-31.
- 5 She J, Yang P, Hong Q, Bai C. Lung cancer in China: Challenges and interventions. *Chest* 2013; 143(4): 1117-26.
- 6 Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469(7330): 314-22.
- 7 Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807(6): 552-61.
- 8 Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9(6): 425-34.
- 9 Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* 2013; 3: 292.
- 10 Perez-Jannotti RM, Klein SM, Bogenhagen DF. Two forms of mitochondrial DNA ligase III are produced in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 48978-87.

- 11 Guo J, Zheng L, Liu W, Wang X, Wang Z, Wang Z, *et al.* Frequent truncating mutation of TFAM induces mitochondrial DNA depletion and apoptotic resistance in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; 71(8): 2978-87.
- 12 Bestwick ML, Shadel GS. Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(6): 283-91.
- 13 Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 2004; 13(9): 935-44.
- 14 Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, *et al.* Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(6): 1640-5.
- 15 Mo M, Peng F, Wang L, Peng L, Lan G, Yu S. Roles of mitochondrial transcription factor A and microRNA-590-3p in the development of bladder cancer. *Oncol Lett* 2013; 6(2): 617-23.
- 16 Lin CS, Lee HT, Lee SY, Shen YA, Wang LS, Chen YJ, *et al.* High mitochondrial DNA copy number and bioenergetic function are associated with tumor invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Mol Sci* 2012; 13(9): 11228-46.
- 17 Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer* 1993; 72(1): 37-41.
- 18 Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: Alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980; 65(1): 128-35.
- 19 Guo W, Liu W, Hong S, Liu H, Qian C, Shen Y, *et al.* Mitochondria-dependent apoptosis of con A-activated T lymphocytes induced by asiatic acid for preventing murine fulminant hepatitis. *PLoS One* 2012; 7(9): e46018.
- 20 Liu YZ, Lan LH, Huang K, Wang RR, Xu CC, Shi Y, *et al.* Inhibition of Lon blocks cell proliferation, enhances chemosensitivity by promoting apoptosis and decreases cellular bioenergetics of bladder cancer: Potential roles of Lon as a prognostic marker and therapeutic target in bladder cancer. *Oncotarget* 2014; 5(22): 11209-24.