DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.023
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
292 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0292-03

三个鼠源性肿瘤细胞系的RAPD分析

李淑蓉[1],陈意生[1],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]实验动物中心;重庆 400038)

提 要:目的 探讨鼠源性肿瘤细胞系基因组不稳定程度或基因组损伤与肿瘤发生的关系。方法 用145条RAPD引物对鼠源性Lewis肺癌、SCC891乳腺癌及B_{16}黑色素瘤及其相应正常组织基因组DNA进行RAPD扩增,扩增产物在含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪上观察照相。结果 145条引物绝大多数能扩增出清晰、明显的条带。多数引物扩增出的条带呈单态性,在肿瘤及其相应正常组织之间无差异。部分引物扩增出的DNA序列在肿瘤组织与其相应正常组织间存在差异,表现为多态性,即肿瘤组织与其相应正常组织的DNA片段相比,出现带的缺失、增加、移动和强度变化。扩增Lewis肺癌的105条引物中有25条表现出多态性;扩增B_{16}黑色素瘤的105条引物中有24条表现出多态性;扩增SCC891乳腺癌的120条引物中有18条表现出多态性。结论 RAPD扩增结果表明三个恶性度较高的瘤株,其基因组损伤程度亦较高,表现为基因拷贝数的增加或等位基因的丢失,进一步证实了细胞的癌变与基因组某些改变密切相关。

关键词:肿瘤;遗传改变;随机扩增多态DNA
中图法分类号:R34-33;R394-33;R73 文献标识码:A

Analysis of three mouse tumor cell lines by RAPD

LI Shu-rong, CHEN Yi-sheng, WEI Hong (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of genomic instability or genomic damage in mouse tumorigenesis. Methods Genomic DNAs from cancer and corresponding normal tissues were amplified by RAPD with 145 10-bp random primers. PCR products from RAPD were electrophoretically separated in agarose gels and banding profiles were visualized by ethidium bromide staining. Results Amplification products produced in most of primers were monomorphic. Some of the primers generated polymorphic profile when tumor RAPD profile was compared to that of its normal tissue DNA. The alterations exhibited in tumor DNA included the loss of a normal band, appearance of a new band and intensity changes. Twenty-five of the 105 primers in Lewis lung cancer, 24 of the 105 primers in B_{16} melanoma, 18 of the 100 primers in SCC891 mammary carcinoma generated polymorphic profile. Conclusion The higher level of random genomic damage in the three tumor cell lines have been detected by RAPD. Increased band intensity in tumor tissue DNA reflects the presence of extra copies of these sequences; loss and decrease in the intensity of RAPD bands in tumor tissue may reflect allelic losses. It is further certified that tumor is the result of some genomic changes.

Key words: neoplasms; genetic alterations; RAPD

肿瘤的发生是多种遗传改变积累的结果,本质上是基因组DNA发生了变化。肿瘤中相关癌基因和抑癌基因的研究已有大量报道,而有关肿瘤遗传不稳定性增加的方式之一——微卫星不稳定性也有许多文献。肿瘤分子遗传学研究中虽有多种方法,但RAPD(Random amplified polymorphic DNA)技术不仅具备了常规PCR技术的优点,在肿瘤研究中亦显示出其优越性,随机引物由于无位点特异性,对整个基因组进行检测,扩增的大量序列产生复杂的DNA指纹,容易检出肿瘤组织基因组DNA的细微改变[1];由于引物的随机性,其扩增出的少量DNA序列在基因组中具代表性,无染色体位点的倾向;其次是容易对差异片段进行克隆并作进一步研究[2,3]。为探讨基因组不稳定程度或基因组损伤及其遗传改变在肿瘤发生中的作用,我们用RAPD技术对鼠源性Lewis肺癌、鼠源性乳腺癌及鼠源性黑色素瘤基因组的遗传改变进行检测。比较肿瘤组织及其来源小鼠正常组织的DNA指纹,寻找肿瘤细胞特异的遗传改变,为了解肿瘤发生发展的机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

Lewis肺癌细胞株由第三军医大学实验动物中心保存。SCC891乳腺癌细胞株由第三军医大学实验动物中心魏泓等建立。B_{16}黑色素瘤购自中科院上海细胞所。C_{57}BL/6J和BALB/c小鼠由第三军医大学实验动物中心提供,鼠龄6~8周,雌雄兼。Lewis肺癌和B16黑色素瘤分别接种于C_{57}BL/6J小鼠皮下,SCC891注射于BALB/c小鼠皮下,待瘤块大小长到1~1.5 cm时,取瘤组织块,去除结缔组织及血液备用;同时取正常C_{57}BL/6J和BALB/c小鼠肝脏备用。

1.2 试剂与引物

10× buffer、TaqDNA聚合酶、$MgCl_2$、dNTP均为上海生物工程公司产品。随机引物为美国Operon Technologies公司产品(10 bp),实验用引物为AB-0320-kitN、AB-0320-kit2、AB-0 320-kit3、AB-0 320-kit4、AB-0 320-kit5、AB-0 320-kit6、AB-0 320-kit7(简称为ABN)七套引物,每套20条引物,另加AB-0 320-kit8(5、12、16号)、AB-0 320-kit9(6、7号),共145条引物。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900173)
作者简介:李淑蓉(1965—),女,四川省双流县人,博士,副教授,主要从事分子病理方面的研究。电话:(023)68752283
收稿日期:2001-05-04;修回日期:2001-07-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　基因组 DNA 的提取

瘤组织块及小鼠正常组织加少许液氮研碎, 常规方法加入消化液消化, 用酚、氯仿提取 DNA, 乙醇沉淀, TE 溶解, 置 4 ℃冰箱备用。

1.4　RAPD—PCR 反应条件及扩增程序

反应总体积为 25 μl, 含 2.5 μl 10× buffer, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 2 μmol/L 引物, 25 ~ 50 ng 模板 DNA, TaqDNA 聚合酶 1.5 个单位。反应程序为: 94 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 1 min, 38 ℃复性 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 40 个循环后, 72 ℃延伸 10 min。扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外透射仪上观察照相。

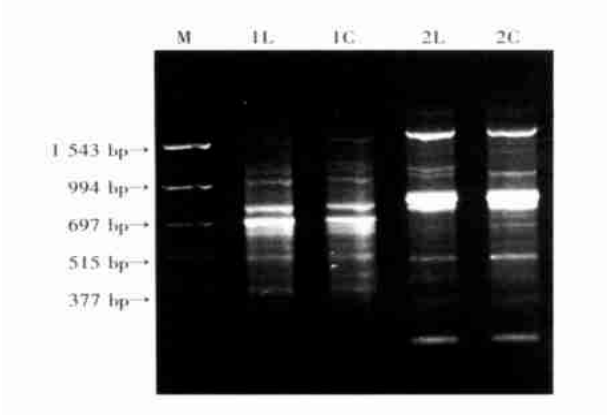
2　结果

本实验所用 145 条引物绝大多数能扩增出清晰、明显的条带, 条带数一般为 4 ~ 16 条, 少数为 2 ~ 3 条或 16 条以上, 片段大小在 200 ~ 2 500 bp 之间。

2.1　Lewis 肺癌的 RAPD 分析

Lewis 肺癌来源于 C_{57}BL/6J 小鼠, 因此比较 Lewis 肺癌移植瘤基因组 DNA 与正常 C_{57}BL/6J 小鼠肝组织基因组 DNA 的 RAPD 扩增图。所用引物为 AB2、4、5、6、7 五套引物及 AB8(5、12、16 号)、AB9(6、7 号), 共 105 条引物。

多数引物扩增出的条带呈单态性, 在肿瘤及其相应正常组织之间无差异, 见图 1 的 1L、C。105 条引物中有 25 条扩增出的 DNA 序列在肿瘤组织与其相应正常组织间存在差异, 表现为多态性, 即肿瘤组织与其相应正常组织的 DNA 片段相比, 出现带的缺失、增加、移动和强度变化。其中 5 条引物的扩增产物在肿瘤组织出现带的增加, 5 条引物的扩增产物出现带的缺失, 8 条引物带增强, 11 条引物出现带减弱。在这些多态性引物中, 引物 AB1-19 扩增出的条带在约 1 000 bp 位置, 肿瘤组织比其相应正常组织多一条带, 见图 1 的 2L、C, 表现为带的增加。引物 AB6-15 和 AB6-20 的扩增产物分别在约 1 500 bp 和 600 bp 的位置表现带密度增强, 见图 2。



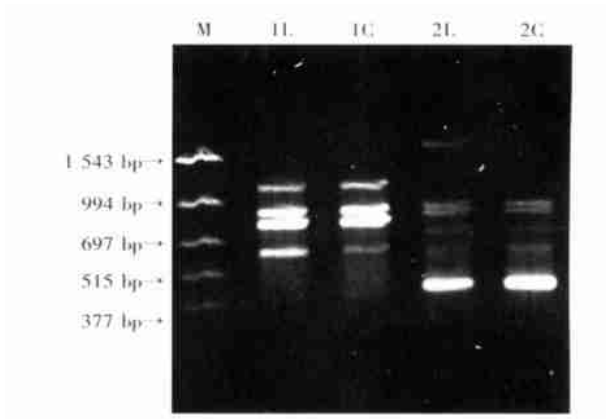
M: Marker; L: Lewis lung cancer; C: C57BL/6J

图 1　1L、C 呈单态性; 引物 **AB1-19** 扩增产物在约 **1 000 bp** 位置呈现带增加(**2L、C**)

Fig 1　Monomorphic band pattern in 1L, C; Band increasing in 2L, C with primer AB1-19

2.2　B_{16}黑色素瘤的 RAPD 分析

B_{16}黑色素瘤来源于 C_{57}BL/6J 小鼠, RAPD 分析比较 B_{16}移植瘤与 C_{57}BL/6J 小鼠正常基因组 DNA 之间的差异。所用引物为 AB2、3、4、6、7 五套引物及 AB8(5、12、16 号)、AB9(6、7 号), 共 105 条引物。

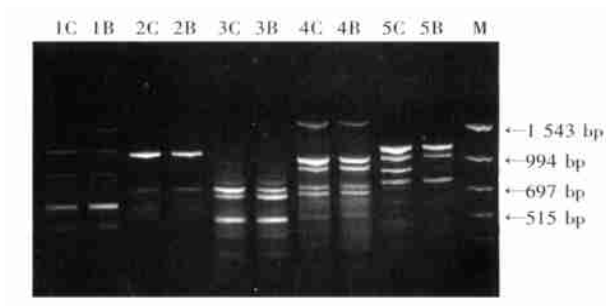


M: Marker; L: Lewis lung cancer; C: C57BL/6J

图 2　引物 **AB6-20**(**1L、C**)和引物 **AB6-15**(**2L、C**)扩增产物表现带强度增加

Fig 2　Band-intensity increasing with primer AB6-20(1L, C) or AB6-15(2L, C)

多数引物扩增出的条带在肿瘤组织及其相应正常组织之间无差异, 见图 3 的 2C、B, 3C、B, 4C、B。105 条引物中有 24 条引物扩增出的条带表现出多态性。其中 4 条引物的扩增产物在肿瘤组织出现带缺失, 8 条引物出现带增加, 8 条引物出现带增强, 9 条引物出现带减弱。引物 AB7-5 在约 900bp 的位置扩增带密度明显降低, 见图 3 的 5C、B。



M: Marker; C: C57BL/6J; B: B16 melanoma

图 3　**2C、B, 3C、B, 4C、B** 呈单态性; **5C、B** 表现带明显减弱; **1C、B** 呈现带强弱变化

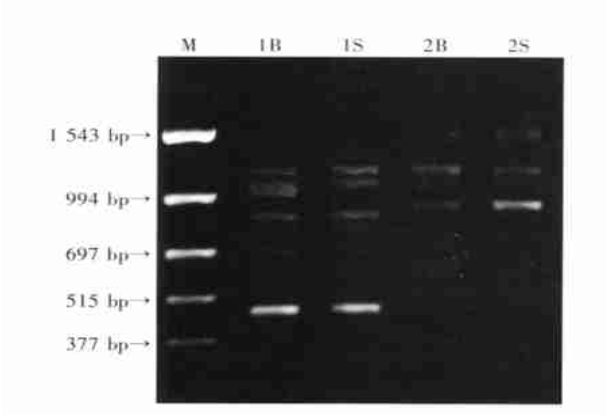
Fig 3　Monomorphic band pattern in 2C, B; 3C, B; 4C, B. Band intensity decreasing in 5C, B; band-intensity changes in 1C, B

2.3　SCC891 乳腺癌的 RAPD 分析

SCC891 乳腺癌来源于 BALB/c 小鼠, 比较 SCC891 乳腺癌移植瘤与 BALB/c 小鼠正常基因组 DNA 之间的差异。所用引物为 AB2、3、4、6、7 五套引物, 共 100 条引物。多数引物扩增出的条带呈单态性。100 条引物中有 18 条引物扩增出的条带在肿瘤组织与其相应正常组织之间存在差异。其中 5 条引物的扩增产物在肿瘤组织呈现带缺失, 4 条引物出现带增加, 7 条引物呈现带减弱, 4 条引物的扩增带强度增加。引物 AB2-5 的扩增

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

图谱可见肿瘤组织少一条约 1 000 bp 的条带，即带缺失，见图 4 的 1B、S；引物 AB2-9，见图 4 的 2B、S。的扩增图谱可见带强度增加和减弱。



L：Lewis lung cancer；S：SCC891；B：BALB/c；M：Marker

图 4 引物 AB2-5 的扩增图谱可见肿瘤组织少一条约 1 000 bp 的条带；引物 AB2-9 扩增产物表现带强度增加和减弱

Fig 4 Band missing with primer AB2-5, band-intensity change with primer AB2-9

3 讨论

我们采用随机引物法，用 145 条 RAPD 引物对三个肿瘤细胞株基因组进行扫描，发现肿瘤组织中存在丰富的多态性，即比较肿瘤组织及其来源小鼠正常组织的 RAPD 扩增图谱，出现瘤组织带强度增加或减少、带缺失或增加，进一步证实了细胞的癌变与基因组某些改变密切相关。

RAPD 扩增带强度增加的意义：Peinado 等[4] 证明随机引物 PCR 扩增中肿瘤组织 DNA 扩增带强度增加反映这些序列存在额外的拷贝，它可能是由于瘤细胞非整倍性引起的基因扩增或染色体失衡。随机引物 PCR 对检测微量遗传物质量的获得（如三倍体、四倍体）有其技术上的优势，因为常规等位基因分型法如 RFLP 或 MS 不易检测到这种基因组改变。染色体上某些序列的获得意味着某个或某些基因存在于相应的染色体上，由于其产物给瘤细胞以生长或生存优势，使其在肿瘤发展中选择了染色体获得。肿瘤中普遍存在 DNA 序列的获得。De Juan 等[5] 用 AP-PCR 证明非小细胞肺癌（NSCLC）中存在高频率 DNA 序列的获得，并认为基因拷贝数的增加在 NSCLC 中起主要作用。Arribas 等[6] 用随机引物 PCR 证明大肠癌中也存在较高频率的 DNA 序列增加（扩增带中 16% 为序列获得，13% 为序列丢失）。Achille 等[7] 证明十二指肠乳头肿瘤也存在 AP-PCR 扩增带强度增加。比较基因组杂交等分子细胞学分析证明了肿瘤细胞系和原发肿瘤中频发多位点扩增，人体肿瘤中频发出现的基因扩增导致癌基因过度表达，使肿瘤细胞具生长优势。本实验中，Lewis 肺癌 25 条多态性引物中有 8 条引物的扩增产物表现为带强度增加，B_{16}黑色素瘤 24 条多态引物中有 8 条引物出现扩增带增加，SCC891 乳腺癌中 18 条多态引物有 4 条出现带强度增加。因此，本研究中大量过多 DNA 序列的出现表明基因拷贝数适度增加在肿瘤发生中的重要作用。

RAPD 扩增带强度减弱的意义：RAPD 扩增中肿瘤组织带强度降低代表等位基因的丢失，等位基因的丢失即是肿瘤细胞染色体节段性丢失或包括抑癌基因在内的 DNA 片段的丢失。这样，位于该基因附近的 DNA 多态标记也随着共同丢失。Weinberg[8] 认为人体肿瘤中染色体缺失是所涉区域含肿瘤抑制基因。Peinado[4] 和 Arribas 等[6] 用随机引物法检测到大肠癌中扩增带减弱或缺失，亦即等位基因的丢失，等位基因丢失的聚集是肿瘤进展过程中基因组不稳定增加的结果。Malkhosyan 等[9] 用 AP-PCR 鉴定出大肠癌 4 号染色体上含潜在肿瘤抑制基因的新的基因组区域，这些序列的丢失与转移时期相关，认为含这些序列丢失的肿瘤加强了转移能力。本研究也表明 Lewis 肺癌、B_{16}黑色素瘤、SCC891 乳腺癌中频发的 DNA 序列缺失，与肿瘤的发生和转移相关。

本研究证明 Lewis 肺癌、B_{16}黑色素瘤、SCC891 乳腺癌的发生与肿瘤基因组 RAPD 扩增带的强弱变化、增加和缺失相关，是遗传改变聚集的结果。这些 DNA 改变很可能是某些癌基因、抑癌基因的激活或失活及不同机制引起基因组不稳定的结果。RAPD 法容易分析基因组损伤程度，本实验所用三株瘤株都是恶性度较高的肿瘤，证明肿瘤的发生与遗传改变积累相关。

参考文献：

[1] 李淑蓉，陈意生，魏 泓. 应用 RAPD 技术检测肺巨细胞癌转移细胞株的遗传学改变[J]. 临床与实验病理学杂志，2000，16(5)：394－396.

[2] 李淑蓉，陈意生，魏 泓. 肌色素上皮源性因子基因与黑色素瘤的发生相关[J]. 中华病理学杂志，2001，30(4)：281－284.

[3] 李淑蓉，陈意生，魏 泓. Lewis 肺癌的 RAPD 分析及其差异片段克隆[J]. 中国肺癌杂志，2001，4(5)：340－343.

[4] Peinado M A, Malkhosyan S, Velazquez A, *et al*. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorrectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 10 065－10 069.

[5] De Juan C, Iniesta P, Vega F J, *et al*. Prognostic value of genomic damage in non-small-cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 1998, 77(11): 1 971－1 977.

[6] Arribas R, Capella G, Tortola S, *et al*. Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(10): 3 230－3 240.

[7] Achille A, Baron A, Zamboni G, *et al*. Chromosome 5 allelic losses are early events in tumours of the papilla of Vater and occur at sites similar to those of gastric cancer[J]. Br J Cancer, 1998, 78(12): 1 653－1 660.

[8] Weinberg R A. Tumor suppressor genes[J]. Science, 1991, 254(): 1 138－1 146.

[9] Malkhosyan S, Yasuda J, Soto J L, *et al*. Molecular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17): 10 170－10 175.

（编辑 潘式文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net