DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.016
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
658 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0658-03

应用AFLP法检测小鼠黑色素瘤B16基因组的变异

梁智勇[1],史景泉[1],魏 泓[2],吴丰春[2],刘丽梅[1],李淑蓉[1],贺光友[1] (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 应用AFLP技术检测小鼠黑色素瘤B16的遗传改变。方法 肿瘤及正常组织基因组DNA经限制性内切酶酶切,连接特异性接头,采用20条与接头相识别的引物进行扩增,扩增产物经含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外透视仪分析、照相。结果 20条引物均扩增出清晰条带,20条引物扩增结果显示B16瘤细胞株与移植瘤基因组间无差异,17条引物扩增结果显示肿瘤与正常组织间无差异,3条引物扩增结果显示肿瘤与正常组织间有差异,表现为扩增带的丢失或增加。结论 黑色素瘤的发生可能与基因组不稳定性有关。

关键词:AFLP;黑色素瘤;基因组不稳定性
中图法分类号:R394-3;R394.2;R739.5 文献标识码:A

Detection of genomic variation of melanoma cell strain B16 with amplified fragment length polymorphism in C57 mice

LIANG Zhi-yong, SHI Jing-quan, WEI Hong, WU Feng-chun, LIU Li-mei, LI Shu-rong, HE Guang-you (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To detect the genetic variant of melanoma cell B16 in C57 mice with amplified fragment length polymorphism (AFLP). Methods Melanoma B16 cells were inoculated into C57 mice after being cultured for 3 to 4 passages. Genomic DNA from melanoma samples and corresponding normal tissue were digested with restriction endonuclease, ligated with specific adapter, and amplified with 20 primers. PCR products were electrophoretically separated in agarose gel and banding profiles were visualized with ethidium bromide staining. Results Clear banding profiles were obtained through the 20 primers and the amplified products showed no difference between those from B16 cell line and from implanted tumor. The amplified products produced by 17 primers were monomorphic, while those by the other 3 primers revealed changes when the products from B16 melanoma AFLP were compared with those from normal tissue DNA. The alterations in tumor DNA included the loss of a normal band and appearance of a new band. Conclusion The occurrence of melanoma might be associated with genetic genomic instability.

Key words: amplified fragment length polymorphism; melanoma; genomic instability

本实验采用的AFLP(Amplified fragment length polymorphism)技术是1993年由荷兰Keygene公司的科学家Zabeau Mare和Vos Pieter[1]发明创建的一种DNA分子标记技术,基因组经酶切后连接特定的接头,形成带接头的特异片段作为模板,通过接头序列和PCR引物3'端的识别进行扩增,将AFLP的可靠性与PCR技术的快捷方便结合起来,克服了以往技术的缺点,重复性好,结果可靠,不需要了解样本基因组序列即可对其进行检测,是是检测基因组变异较为理想的一种方法,在动植物育种、遗传多样性的研究、品系分析、构建遗传图谱等方面应用广泛,但目前在肿瘤研究中的应用还很少。

1 材料与方法

1.1 材料

10只C57小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,小鼠黑色素瘤B16细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。接头与引物均由上海植物生理研究所BECKMAN生物技术示范实验室合成。接头序列为:5'-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3', 3'-GCACTGCCGGCAGT-5'。根据接头序列设计AFLP引物,引物表现为3'端3个碱基的差异,本研究共使用20条引物,见表1。

PCR试剂均为德国BM公司产品。

表1 引物序列

Tab 1 The sequence of primers

Primers	Sequence
1	GACGGCCGTCATGCAGtac
2	GACGGCCGTCATGCAGagg
3	GACGGCCGTCATGCAGacc
4	GACGGCCGTCATGCAGcag
5	GACGGCCGTCATGCAGaca
6	GACGGCCGTCATGCAGcga
7	GACGGCCGTCATGCAGgat
8	GACGGCCGTCATGCAGgct
9	GACGGCCGTCATGCAGgac
10	GACGGCCGTCATGCAGgtc
11	GACGGCCGTCATGCAGtct
12	GACGGCCGTCATGCAGcct
13	GACGGCCGTCATGCAGaag
14	GACGGCCGTCATGCAGtgg
15	GACGGCCGTCATGCAGtcg
16	GACGGCCGTCATGCAGgag
17	GACGGCCGTCATGCAGgcg
18	GACGGCCGTCATGCAGatc
19	GACGGCCGTCATGCAGcac
20	GACGGCCGTCATGCAGctc

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600079, 39900173);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M083);重庆市攻关项目
作者简介:梁智勇(1966—),男,四川省岳池县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话:(023)68754000-73107
通信作者:魏 泓(E-mail:weihong@mail.tmmu.com.cn)
收稿日期:2000-10-30;修回日期:2001-01-15

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

1.2　方法

细胞培养及接种: B16 细胞培养于 1640 培养基(含 10% 小牛血清), 置于含 5% CO_2 的 37 ℃孵箱内, 稳定传代 3~4 代, 于对数生长期取约 10×10^7 瘤细胞接种于 5 只 C57 小鼠皮下, 另 3 只小鼠注射生理盐水, 2 只小鼠作为空白对照, 小鼠饲养 2 周。

切除肿瘤组织及其对应的脾组织, 部分液氮贮存, 部分 10%中性福尔马林固定、石蜡包埋, 部分 3%戊二醛磷酸缓冲液固定, 取未接种瘤细胞的小鼠脾脏作为正常对照。肿瘤组织经电镜观察见瘤细胞内含黑色素小体, 石蜡切片免疫组化 HMB45 抗体染色阳性, 证实为黑色素瘤移植瘤, 再进行以下步骤。

模板制备: 取液氮贮存的瘤组织、其对应小鼠脾脏及正常小鼠脾脏各约 1g, 收集培养的瘤细胞约 10×10^7, 应用酚-氯仿法分别提取其基因组 DNA。基因组 DNA 经 *Pst*I 酶切, 酶切片段经 T4 DNA 连接酶与接头连接, 酶切及连接反应在同一体系进行。20μl 反应体系中, 含基因组 DNA 约 0.2μg, 接头 0.2μg, *Pst*I 酶 20 单位, T4 DNA 连接酶 2 单位, 1 mmol/L ATP。反应条件为: 37 ℃ 1 h, 20 ℃ 1 h, 循环 5 次后, 70 ℃ 15 min 灭活酶, 用去离子水稀释反应液(1∶5), 置 4 ℃备用。

PCR 反应: 25μl 反应体系中含 10× buffer 2.5μl, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, 引物 60 ng, 模板 10 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 200 μmol/L, 反应条件为 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 30 s, 35 个循环后 72 ℃ 10 min。

扩增产物经含溴乙锭(0.5μg/ml)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、照相。

2　结果

20 条引物经扩增后电泳均可见清晰条带, 瘤细胞与移植瘤扩增结果均无差异, 肿瘤及正常组织经 17 条引物扩增无差异, 3 条引物的肿瘤及正常组织扩增结果有差异, 表现为带的增加或丢失。引物 19 扩增结果中瘤组织少一条带, 引物 16、20 扩增结果中肿瘤组织各增加一条带, 见图 1~3。

经重复实验, 结果完全一致, 表明 AFLP 重复性好, 结果可靠。

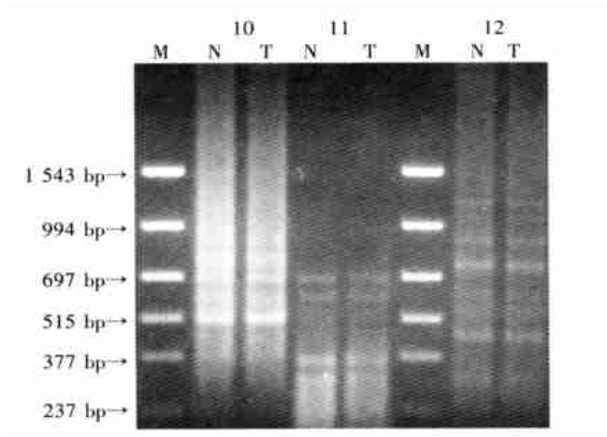


图 1　10~12 号引物扩增产物, 肿瘤与正常组织无差异

Fig 1　Amplified products of primers 10—12 no difference between tumor and its corresponding normal tissue

M: PCR marker; N: Normal tissue; T: Tumor tissue

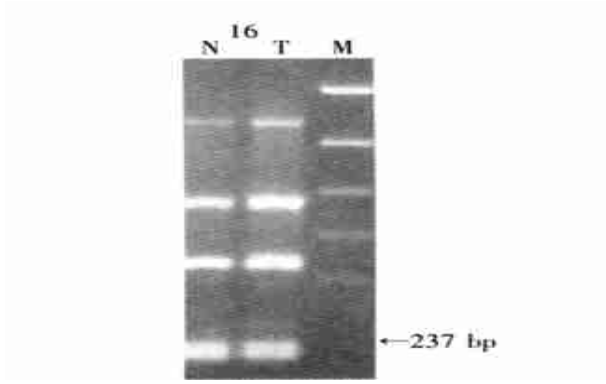


图 2　16 号引物扩增产物显示肿瘤组织增加一条带

Fig 2　An additional band appeared in tumor tissue with primer 16

M: PCR marker; N: Normal tissue; T: Tumor tissue

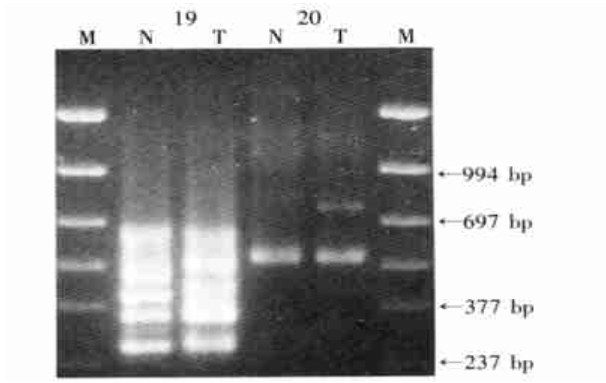


图 3　19 号引物扩增产物显示肿瘤组织少一条带, 20 号引物扩增产物显示肿瘤组织增加一条带

Fig 3　Losing a band in tumor tissue with primer 19, an additional band appeared in tumor tissue with primer 20

M: PCR marker; N: Normal tissue; T: Tumor tissue

3　讨论

AFLP 技术自从创建以来, 已得到广泛应用, 并且不断改进, 模板制备可以用双酶切法或单酶切法, 目前还有应用三种酶切的报道, 结果标记有同位素、银染及荧光标记, 结果分析可以经琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰氨电泳及荧光自动测序仪分析[1~3]。AFLP 技术中具有较高退火温度的引物保证了结果的稳定可靠, 并且由于其根据接头设计引物, 通过引物 3' 端的碱基变化获取多态性信息, 因此适合所有生物体基因组的检测。本研究所采用的 AFLP 技术在 Zabeau Mare 和 Vos 等[1]创建的技术基础上进行了简化, 经典的 AFLP 法的基因组需经过双酶切, 而本实验采用单酶切, 酶切与连接是在同一反应体系内进行的, 只进行一轮 PCR 扩增而不是两轮, 扩增产物经含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳分析, 而不是经放射性标记后进行聚丙烯酰氨电泳分析, 虽然特异性不如双酶切法, 但实验更加快捷、方便。万春玲等[4]及 Picardeau 等[5]证实单酶切法同样可以得到可靠的检测结果, 本实验采用的 20 条引物均扩增出清晰的条带, 且重复性好。

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

来源于 C57 小鼠的 B16 黑色素瘤细胞是经多年长期培养建成的细胞株，目前已商品化，其遗传稳定性可靠。本实验 20 条引物扩增结果显示移植瘤与 B16 瘤细胞株基因组无差异，表明 B16 细胞株接种后仍保持遗传稳定。C57 小鼠是一种近交系小鼠，遗传稳定性好，进行本研究前，我们对 C57 小鼠个体进行检测结果显示个体基因组间无差异，证明本研究所用 C57 小鼠是标准化小鼠，保证了本研究的可靠性。

目前研究表明，大多数肿瘤的发生是多种遗传改变积累的结果，基因组不稳定性是其中改变之一，其实质表现为 DNA 的改变。许多肿瘤中存在基因组不稳定性，如微卫星不稳定性、杂合性缺失、基因重组等，肿瘤的发生发展与之密切相关。黑色素瘤是一种侵袭性强、极易发生转移的肿瘤，因此倍受研究者关注，但其发病机制至今尚未完全阐明。以往研究证实黑色素瘤的发生发展与基因组不稳定性有关，Peris 等[6] 在人黑色素瘤中检测到微卫星不稳定性及杂合性缺失；Gordon 等[7] 应用比较基因组杂交技术证实人黑色素瘤的侵袭生长、转移特性与 3 号染色体上的基因缺失及 8q 上基因的扩增有关；Usmani[8] 研究表明小鼠黑色素瘤的转移与基因重组相关。基因组不稳定性指基因组 DNA 随机发生的多态性变化，AFLP 技术扩增序列产生复杂的 DNA 指纹，能够反映基因组细微的变化，有利于差异片段的检出，因此 AFLP 检测结果能够反映基因组多态性变化-即基因组不稳定性[1,3~5]。尽管 AFLP 技术应用广泛，但目前在肿瘤研究中应用还较少，Fukuda 等[9] 应用 AFLP 法克隆出与大鼠骨肉瘤转移有关的 4 种差异表达基因，Majima 等[10] 应用 AFLP 技术克隆出与肾癌发生相关的基因，表明 AFLP 技术适用于肿瘤差异片段的检测。本研究应用 AFLP 法通过 20 条引物对肿瘤基因组变化进行检测，3 条引物扩增结果显示黑色素瘤 B16 肿瘤与正常组织基因组有差异，表现为带的丢失或增加，共得到 3 条差异片段，提示黑色素瘤 B16 发生过程中出现了基因组变异，这些变化可能是由于基因突变、缺失、扩增或重组等因素引起的。差异片段的检出有利于认识肿瘤基因组发生的变化，进一步对差异片段的筛选、鉴定更有助于明确黑色素瘤的发生机制，此点有待深入研究。

参考文献：

[1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4 407—4 414.

[2] Lindstedta B A, Heir E, Vardunda T, *et al*. A variation of the amplified-fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction endonucleases and assessment of the enzyme combination BglII-MfeI for AFLP analysis of Salmonella enterica subsp. enterica isolates[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 189(1): 19—24.

[3] Savelkoul P H M, Aarts H J M, Hass J D, *et al*. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3 083—3 091.

[4] 万春玲，朱玉芳，谭远德. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用[J]. 生物技术，1999, 9(5): 4—9.

[5] Picardeau M, Prod'hom G, Raskine L, *et al*. Genotypic characterization of five subspecies of Mycobacterium kansasii[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(1): 25—32.

[6] Peris K, Keller G, Chimenti S, *et al*. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma[J]. J Invest Dermatol, 1995, 105(4): 625—628.

[7] Gordon K B, Thompson C T, Char D H, *et al*. Comparative genomic hybridization in the detection of DNA copy number abnormalities in uveal melanoma[J]. Cancer Res, 1994, 54(17): 4 764—4 768.

[8] Usmani B A. Genomic instability and metastatic progression[J]. Pathobiology, 1993, 61(2): 109—116.

[9] Fukuda T, Kido A, Kajino K, *et al*. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA—AFLP method[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 35—40.

[10] Majima S, Kajino K, Fukuda T, *et al*. A novel gene rising dbl quote, left (low) Niban" upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach[J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(9): 869—874.

（编辑 陈聪连）

（上接 657 页）

3 讨论

尼卡地平通过阻滞血管钙通道降低血压[3]。乌拉地尔的降压机制较复杂，主要分为中枢和外周的作用[4]。在外周通过阻断血管 α_1 肾上腺能受体，在中枢兴奋 5-羟色胺-1A 受体（降低延髓心血管中枢的交感反馈）。本观察中，乌拉地尔组起效较快可能与其降压的双重机制有关。在副作用方面，乌拉地尔组低血压略多，也可能与其降压的双重机制有关；但心动过速、面红等副作用少见，与其能抑制心血管中枢的交感反馈有关；尼卡地平因无抑制交感作用，在降压的同时，反射性地激活交感神经系统，导致心动过速、面红等副作用。

在观察护理中，要注意乌拉地尔静滴的过程中血压下降的速度和幅度不宜过快过大，当收缩压降至 180 mmHg 时，应及时减慢滴速。本观察中，乌拉地尔组 3 例低血压的发生均是在收缩压降至 150~160 mmHg 时才开始减慢滴速，但此时血压仍继续下降，其中 1 例血压下降至 90/50 mmHg，经停用乌拉地尔，并静脉用多巴胺后血压才升至 150/70 mmHg；相对于乌拉地尔组，尼卡地平组血压下降较乌拉地尔组慢而平稳。应用这两种药物一定要密切观察血压的变化，随时调整输液滴速。

本观察中，尼卡地平组的副作用较多见，超过半数的病人有面红，但基本不影响治疗。在观察疗效的同时，要作好心理护理，消除病人因情绪因素，导致的交感兴奋引起的血压升高。在用药前，把药物的副作用先告诉病人，使之有思想准备。

关键词：高血压；治疗；护理
中图法分类号：R473.5；R544.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈灏珠，李宗明. 内科学[M]. 第 4 版. 北京：人民卫生出版社，1998. 228—229.

[2] 刘力生，龚兰生，孔华宇，等. 临床高血压病学[M]. 天津：天津科学技术出版社，1990. 227.

[3] 龙 露，陶 萍，郑德裕 等. 尼卡地平静脉给药治疗高血压急症的疗效观察[J]. 中国循环杂志，1996, 11(3): 131—133.

[4] Hirschl M M, Binder M, Bur A, *et al*. Safety and efficacy of urapidil and sodium nitroprusside in the treatment of hypertensive emergencies[J]. Intensive Care Med, 1997, 23(8): 885—888.

（编辑 薛国文）

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