DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.016
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
36 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000
文章编号:1000-5404(2000)01-0036-03

论著

非小细胞肺癌的随机扩增多态DNA分析

李淑蓉[1],陈意生[1],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]基础医学部病理学教研室;[2]实验动物中心;重庆 400038)

提 要 目的:用RAPD技术检测非小细胞肺癌组织的遗传改变。方法:选用40条含10个碱基的随机引物对16例非小细胞肺癌进行RAPD扩增,扩增产物在含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外透视仪上观察照相。结果:40条引物都能扩增出清晰的条带,其中22条引物产生的条带在肿瘤与其相应正常组织间无差异,表现为单态性;18条引物扩增出的DNA序列在肿瘤与其相应正常组间存在差异,表现为带的缺失、增加、移动和带强弱差异。结论:用RAPD技术检测出肺癌组织中具较高水平的遗传改变,这种改变与肺癌的发生相关。

关键词 肺肿瘤;遗传改变;RAPD
中图法分类号 R394.3;R734.2 文献标识码 A

Genetic alterations in non-small cell lung cancer detected by randomly amplified polymorphic DNA analysis

LI Shu-rong, CHEN Yi-sheng, WEI Hong (Department of Pathology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To detect the genetic genomic variant in non-small cell lung cancer (NSCLC) by randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD). **Methods**: Genomic DNAs from cancer and corresponding normal tissues were amplified with RAPD using 40 10-bp primers. PCR products from RAPD were electrophoretically separated in agarose gel and banding profiles were visualized by ethidium bromide staining. **Results**: 22 of the 40 primers used for screening NSCLC produced amplification products that were monomorphic and the remaining 18 revealed changes when the NACLC RAPD profile was compared with that of its normal tissue DNA. A multiband profile was seen for all the primers with the total number of bands per primer varying from 2 to 14. The sizes of these bands ranged from 200 bp to 2 kb. The alterations exhibited in tumor DNA included the loss of a normal band, appearance of a new band and intensity changes of a band. **Conclusion**: Genetic alterations in NSCLC genomic DNA have been frequently detected by RAPD, which is associated with tumorigenesis of NSCLC.

Key words lung neoplasm; genomic alteration; RAPD

肺癌的发生是一个复杂的过程,是多种遗传改变积累的结果,基因组不稳定性增高是肺癌的主要遗传改变之一。许多研究者用微卫星标记分析基因组不稳定性,得出的结论不尽一致[1]。新近发展起来的RAPD(Random amplified polymorphic DNA)方法是在PCR基础上发展起来的一种DNA指纹技术,使用一系列引物可检测到覆盖整个基因组范围的遗传改变,而无须预先了解被测基因组相关分子生物学信息[2,3]。这项技术已广泛应用于动植物种系鉴定、遗传分析、连锁图的构建、疾病诊断、基因分离等[4]。随机引物法亦已用于检测大肠癌、卵巢癌、肺癌、皮肤癌、脑膜瘤等的基因组不稳定性及分离差异DNA片段,并将其克隆定位[5~7]。为探讨肺癌基因组不稳定程度,我们用RAPD技术对肺癌基因组的遗传改变进行检测,比较同一个体肿瘤组织及其相应正常组织的DNA指纹,寻找肿瘤细胞特异的遗传改变,了解肿瘤发生发展的机制,为临床诊断和预后判断提供理论基础。

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:李淑蓉(1965.7),女,四川省双流县人,博士研究生,副教授,主要从事实验肿瘤病理学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752246

收稿日期:1999-04-10;修回日期:1999-10-25

1 材料与方法

1.1 标本

16例非小细胞肺癌,新鲜手术切除、液氮冻存的肿瘤组织

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

及其相应的正常组织，来源于第三军医大学附属西南医院和新桥医院。

1.2　试剂与引物

10× buffer、Taq 酶、$MgCl_2$、dNTP 均为德国 BM 公司产品。所用随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品，每一引物为 10 个碱基的寡聚核苷酸，实验用 AB-0320-kit2、AB-0320-kit4、B-0320-kit5 3 套引物，共 60 条，选用其中 40 条引物。

1.3　基因组 DNA 的提取

瘤组织块及其相应正常组织加少许液氮研碎，按常规方法加入消化液（10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，100 mmol/L EDTA，0.5% SDS，20 μg/ml RNase，100 μg/ml 蛋白酶 K）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，其中含 25 μl 10× buffer，2.5 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dNTP，0.2 μmol/L 引物，25～50 ng 模板 DNA，TaqDNA 聚合酶 1.5 U。反应程序为：94℃预变性 2 min；94℃变性 1 min，36℃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，电泳缓冲液为 1× TBE，紫外透射仪上观察照相。

2　结果

本实验所选用 40 条引物都能扩增出清晰、明显的条带，条带数在 2～14 条之间，片段大小为 200～2 000 bp。40 条引物中有 22 条引物产生的片段在肿瘤及其相应正常组织之间无差异，表现为单态性，其中引物 AB5-14 扩增产物不仅在肿瘤与正常组织间无差异，而且所有个体间都呈单态性，见图 1。引物 AB2-8 和 AB4-5 扩增出的条带分别在第 1 例和第 2 例表现单态性，见图2。40 条引物中有 18 条扩增出的 DNA 序列至少在一例肿瘤呈现多态性，见表 1，即肿瘤组织与其相应正常组织的 DNA 序列相比，出现带的缺失、增加、移动和强度变化。用 18 条中的每条引物对 16 例肺癌标本进行 RAPD 扩增，一般 1～3 例呈现多态性。如图 3 所示，引物 AB2-19 扩增出的条带在第 5 例表现为带的缺失和增加，第 7 例用引物 AB2-2 扩增后出现带强度增加；图 4 的第 6 例增加一条约 337 bp 的条带，第 13 例在约 350 bp 的位置出现带的缺失。

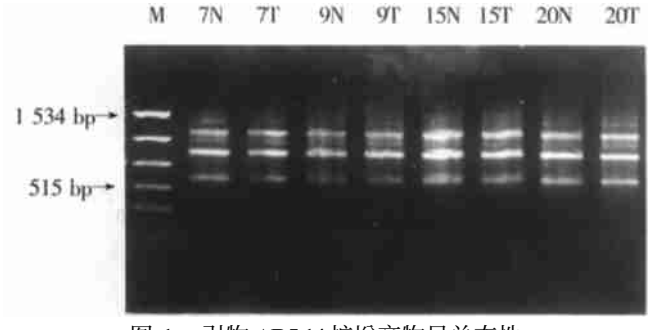


图 1　引物 **AB5-14** 扩增产物呈单态性

Fig 1　Monomorphic band pattern with primer AB5-14

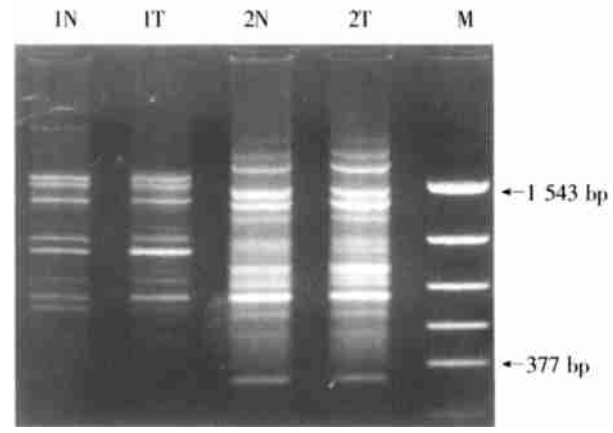


图 2　引物 **AB2-8** 和 **AB 4-5** 扩增产物呈单态性

Fig 2　Monomorphic band pattern with primer AB2-8 and AB4-5

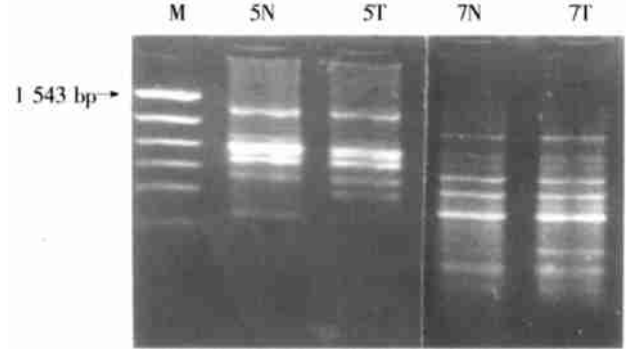


图 3　引物 **AB2-19** 扩增产物在第 **5** 例（**5N**、**5T**）呈现带缺失和增加；引物 **AB2-2** 扩增产物在第 **7** 例（**7N**、**7T**）表现带强度增加

Fig 3　Band loss and appearance in sample 5 with primer AB2-19 ;intensified band change in sample 7 with primer AB2-2

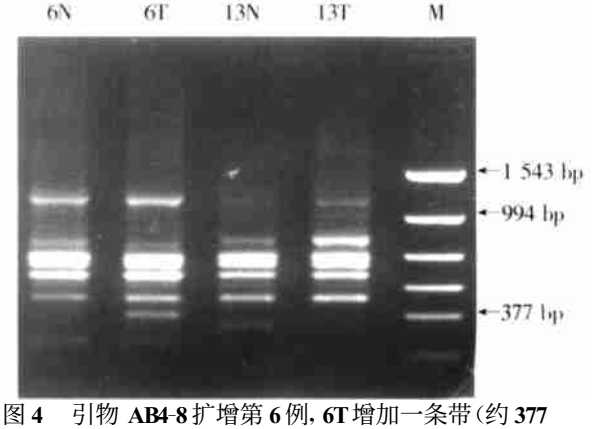


图 4　引物 **AB4-8** 扩增第 **6** 例，**6T** 增加一条带（约 **377 bp**）；**AB5-11** 扩增第 **13** 例，**13T** 出现带缺失

Fig 4　Band appearance in sample 6 with primer AB4-8 one in 6T（377bp） ;band loss in sample 13 with primer AB5-11 one in 13T

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

表 1 肺癌中产生多态性的引物序列

Tab 1 Primer sequences of polymorphisms in lung cancer

Primer	Primer sequences	Primer	Primer sequences
AB2-02	GGTGCGGGAA	AB4-09	TCCCACGCAA
AB2-07	AGATGCAGCC	AB4-13	GTCAGAGTCC
AB2-07	CTTCACCCGA	AB4-16	TCGGCGGTTC
AB2-18	GGACTGCAGA	AB5-04	CACAGAGGGA
AB2-19	ACGGCGTATG	AB5-05	CAAGGGCAGA
AB2-20	AACGGTGACC	AB5-08	AACGCCGACA
AB4-01	GGCACGTAAG	AB5-11	TTCCCCGCGA
AB4-07	CAGCACTGAC	AB5-16	GGTGAACGCT
AB4-08	CCTCCAGTGT	AB5-20	GACCAATGCC

3 讨论

肺癌的发生是多种遗传改变积累的结果。癌基因的激活、抑癌基因的失活及遗传不稳定性增加是肺癌的主要遗传改变。肺癌中相关癌基因和抑癌基因的研究已有大量报道，而有关肺癌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。我们采用新近发展起来的随机引物法，对肺癌的整个基因组进行扫描，检测到肺癌基因组有较大程度的损伤。

肿瘤分子遗传学研究中虽有多种方法，但 RAPD 技术不仅具备了常规 PCR 技术的快速、安全、简便、灵敏度高的特点，由于引物的通用性，在未知研究材料基因组序列的条件下，只需极少量基因组 DNA，可对其进行检测分析。同时，RAPD 扩增带的范围一般在 0.2～2 kb 之间，弥补 Southern 杂交（一般大于 2 kb）和微卫星定位（一般小于 400 bp）的不足。微卫星引物由于其位点特异性，需大量特异引物对已知位点进行分析；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。RAPD 技术用于生物遗传多态性等方面已取得大量成果，而在肿瘤研究中报道较少。Ong 等[6]用 7 条随机引物检测肺癌临床标本及其相应正常组织基因组 DNA，发现 95% 肺癌组织中至少有一条引物表现出基因组不稳定性，具体表现为扩增带的移动、丢失或（和）带强度增加，认为基因组重排与肺癌发生相关，RAPD 分析用于检测肺癌组织中基因组不稳定性是有用的方法。Dil-Afroze 等[7]用 RAPD 技术检测脑肿瘤，29 条引物用于 7 例脑膜瘤，所有肿瘤组织都具 DNA 的改变；18 条引物用于 24 例胶质瘤，21 例肿瘤组织 DNA 发生改变，其改变包括带的丢失、增加和带强度增加。Peinado 等[5]用随机引物法检测分离重叠大肠癌中的差异 DNA 片段，克隆、测序并将其定位于 17 号染色体短臂。Sood 等[8]用随机引物法分析基因组不稳定性与卵巢癌的关系，认为基因组不稳定性与癌的分级和家族史相关，这种方法不失为检测基因组不稳定性的一种方法。

我们用 40 条引物，其中 18 条引物至少在一例肺癌检测出多态性，与 Ong 及 Dil-Afroze 的结果相比，多态检出率要低一些，这一方面可能是临床标本来源不同，引物不同所致；另一方面可能由于我们选用相应正常肺组织作对照（镜下观察无瘤细胞），而不是同一个体的血液组织，是否因为部分肺组织虽无形态上的改变，而基因组已发生了细微的变化，检测不出差异 DNA 序列。非小细胞肺癌中微卫星不稳定频率为 7%～34%[1]，可能是标本来源不同、所用引物种类及数量不同，结果差异较大。微卫星标记 由于其位点特异性，需大量特异引物，才能使检测结果具普遍性、代表性。我们使用的随机引物由于无位点特异性，是对整个基因组进行检测，可能发现肿瘤细胞特有的差异 DNA 片段，并进一步发现新的肿瘤相关基因，了解肿瘤发生发展的机制。本实验应用 RAPD 方法分析肿瘤组织中的遗传改变，检测到肿瘤与其相应正常组织基因组 DNA 之间的差异，肿瘤基因组 DNA 高频率的损伤，证明肺癌发生与遗传改变积累相关。

参考文献

[1] Fong K M, Zimmerman P V, Smith P J. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 1995, 55(1): 28－30.

[2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7 213－7 218.

[3] Williams J G, Kubelik A R, Liavk K J, *et al*. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6 531－6 535.

[4] 王 文，兰 宏，宏 兵，等. 云南 4 个少数民族的随机多态 DNA 分析[J]. 科学通报，1994，39(20)：1 900－1 903

[5] Peinado M A, Malkhosyan S, Velazquez A, *et al*. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10 065－10 069.

[6] Ong T M, Song B, Qian H W, *et al*. Detection of genomic instability in lung cancer tissue by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(1): 233－235.

[7] Dil-Afroze, Misra A, Sulaiman I M, *et al*. Genetic alteration in brain tumors identified by RAPD analysis[J]. Gene, 1998, 206(1): 45－48.

[8] Sood A K, Buller R E. Genetic instabiltiy in ovarian cancer: a reassessment using an arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. Oncogene, 1996, 13(11): 2 499－2 504.

（编辑 汪勤俭）

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