

人卵巢癌细胞及小鼠 MTX 抗性细胞中 DMs 大小的测定

张钰 邓新宇 白静 李璞 傅松滨

【摘要】 目的 测定肿瘤细胞及耐药性细胞中双微体(double minutes, DMs)的大小。方法 应用 PFGE(Pulsed field gradient gel electrophoresis)与 Southern 印迹杂交技术,对人卵巢癌细胞 UACC-1598 及 氨甲蝶呤(Methotrexate, MTX)抗性的小鼠胚胎成纤维细胞中 DMs 的大小进行检测。结果 发现 UACC-1598 细胞中存在 2.8Mb、2.1Mb 及 1.4Mb 的 DMs 群体,提示多拷贝的扩增基因及其邻近的染色体区域经染色体断裂、易位及重排形成较大的 DMs。同时,用浓度逐渐增高的 MTX 对小鼠胚胎成纤维细胞进行体外诱导,分离出富含 DMs 的不同 MTX 抗性程度的细胞群体。在 MTX 抗性细胞中检测到 2.5Mb 及 1.4Mb 的 DMs 群体,MTX100 细胞中以 1.4Mb 的 DMs 群体为主,而 MTX500 细胞中以 2.5Mb 的 DMs 群体为主。结论 MTX 细胞中产生的扩增子结构在演化过程中趋向于寡聚化或多聚化形成较大片段的 DMs。

【关键词】 基因扩增; 双微体; PFGE; Southern 印迹

The Sizes of Double Minutes in Human Ovarian Cancer Cells and Mouse MTX-resistant Cells Determined by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis and Southern Blotting ZHANG Yu^{1,2}, DENG Xinyu¹, BAI Jing^{1,3}, LI Pu^{1,3}, FU Songbin^{1,4}. (¹Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081; ²State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021; ³Key Laboratory for Medical Cell Biology Engineering of Heilongjiang Higher Education Institutions, Harbin 150081; ⁴Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150081, P. R. China)

Corresponding author: FU Songbin. E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the sizes of double minutes (DMs), one of the predominant amplification structure found in primary tumors and drug-resistant cells. **Methods** PFGE (pulsed field gradient gel electrophoresis) combined with Southern blotting hybridization was used to determine the sizes of DMs in human ovarian cancer cells UACC-1598 and MTX-resistant cell derived from mouse fibroblasts 3T3R500. **Results** The heterogeneous DMs populations of 2.8 Mb, 2.1 Mb and 1.4 Mb in size were detected in UACC-1598 cells, which indicate that multiple copies of amplified genes and surrounding regions underwent chromosomal breakage, translocation and rearrangement to form the larger DMs. On the other hand, MTX-resistant mouse fibroblasts were isolated with stepwise increasing concentrations of MTX. The DMs populations of 2.5 Mb and 1.4 Mb in size containing *DHFR* gene were detected in the cells resistant to the different concentrations of MTX. The 1.4 Mb DMs were the predominant population in MTX100 cells, whereas the 2.5 Mb DMs were the predominant population in MTX500 cells. **Conclusion** These data suggest the initial small amplicons with the tendency of multimerization to form larger DMs during the progression. However, no DMs integrated into chromosome has been observed during the course of our study.

【Key Words】 Gene amplification; DMs; PFGE; Southern blotting

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划, No. 2002BA711A08);国家自然科学基金(No. 30370783);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20040226001)哈尔滨市科技攻关项目资助

作者单位:150081 哈尔滨医科大学医学遗传学教研室(张钰、邓新宇、傅松滨、白静、李璞);100021 北京,中国医学科学院协和医科大学,肿瘤医院肿瘤研究所,分子肿瘤学国家重点实验室(张钰);150081 哈尔滨,黑龙江省普通高校医学细胞生物工程重点实验室(白静、李璞);150081 哈尔滨,黑龙江省生物医药工程重点实验室(傅松滨)

通讯作者:傅松滨(E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn)

癌基因扩增是具有侵袭能力的肿瘤的特征之一,在晚期病例中特别常见,可作为预测肿瘤进展及预后的临床指征^[1~4]。细胞内扩增的基因通常位于两种异常的细胞遗传学结构上,它们是染色体上的均质染色区(homogeneously staining regions, HSRs),以及染色体外的双微体(double minutes, DMs)。DMs 是染色体外成对、环状、可自主复制的染色小体。DMs 见于多种类型的人类实体瘤(原发瘤及转移灶)、细胞系、渗出液或外周血淋巴细胞等,它们是肿瘤病人中基因扩增的主要细胞遗传学标记。活检时,绝大多数病例中的扩增基因位于 DMs 等染色体外结构上^[5]。此外,基因扩增也是肿瘤细胞产生抗药性的一个重要机制^[6~11]。目前,对于 DMs 产生、复制、演化、稳定存在等机制仍未完全阐明。因此,对于 DMs 大小、结构、组成的研究不仅有助于揭示基因扩增的分子机制,而且可为特定肿瘤的临床治疗提供理论依据。

已知的 DMs 的大小从 120kb ~ 5Mb 不等,因此本研究采用分析大片段 DNA 的 CHEF 技术结合 Southern 印迹杂交,检测富含 DMs 的人卵巢癌细胞和小鼠 MTX 抗性细胞中 DMs 分子的大小,进而探讨其结构和组成,为阐明 DMs 产生、复制、稳定存在等机制提供线索。

1 材料和方法

1.1 细胞培养:人卵巢癌细胞 UACC-1598 由香港大学关新元博士惠赠,用含 10% FBS 的 DMEM 全培养基,在 CO₂ 孵育箱中于 5% CO₂、37℃ 条件下进行培养。

来源于 NIH3T3 的小鼠胚胎成纤维细胞 3T3R500 由加拿大卡尔加里大学刘树林教授惠赠,在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,于 5% CO₂、37℃ 条件下进行培养。用浓度逐渐增加的 MTX 连续培养 5 个月,筛选分离出可耐受不同浓度 MTX 的耐药细胞(文中标记为 MTX100 ~ MTX500,数字代表药物的 μmol/L 浓度),以不加 MTX 培养 3 个月的 3T3R500 回复系作为对照。

1.2 脉冲场凝胶电泳(CHEF)

1.2.1 样品制备 收集生长至对数期的细胞,计数后重悬于适量的 PBS,使细胞密度为(1~2)×10⁷/mL,在 37℃ 水浴中平衡。加入等体积 50℃ 温育的 2% 低熔点琼脂糖(SeaPlaque GTG agrose, BMA)混匀后转入模具中,4℃ 放置 10~15min 使其凝固。取出凝胶块置于 3~5V ESP[0.5mol/L EDTA

(pH9.0),1% 十二烷基肌氨酸钠,1mg/mL 蛋白酶 K]溶液中,50℃ 消化 16~24h。消化后,胶块在 ESP 中或 0.5mol/L EDTA(pH9.0)中 4℃ 保存。

1.2.2 DMs 的线性化 ①X-射线照射:将凝胶块置于 0.5mol/L EDTA 中,用 40Gy 的 X 线辐射诱导染色体双链断裂,使 DMs 线性化;②限制性内切酶消化 室温下,用过量 TE buffer 洗凝胶块 2 次,每次 3h,或 4℃ 振荡过夜,用含 1mmol/L PMSF 的 TE buffer 于室温清洗胶块两次,每次 2h,以除去残余的蛋白酶 K。室温下,用 TE buffer 再清洗凝胶块 1 次,4℃ 保存凝胶块。消化前,将胶块置于 100~200μL 的 1×buffer 中,冰上放置 3h。然后,将凝胶块转置于含 30~50U Not I 或 Sac II(2~10U/μg DNA)的 1×buffer 中,冰上放置 3h,然后在 37℃ 进行消化。反应结束后,加入 5mL 0.5mol/L EDTA,室温孵育 5min 以中止反应,处理后的胶块贮存于 TE buffer(pH8.0)中。

1.2.3 酶切片段的 CHEF 电泳 将酶切或 X 射线处理过的胶块置于 0.8% 琼脂糖凝胶的点样孔中,并用相同浓度的琼脂糖封闭点样孔。在适宜的条件下进行 CHEF 电泳,分离大片段线性 DNA 分子,以酵母染色体 *S. cerevisiae*(Stain YNN295, Bio-Rad)和 *H. wingei*(stain YB-4662-VIA, Bio-Rad)为相对分子质量标准。

1.3 Southern 印迹杂交:凝胶在含 1.0μg/mL EB 的新鲜染液中振荡染色 30min 后,在紫外交联仪中用 60mJ UV 照射,然后用凝胶成像系统拍照、存图。用常规的毛细管转移法,以 0.4N NaOH,1.5mol/L NaCl 为转移缓冲液,将 DNA 片段转移至 Hybond N⁺ 尼龙膜。转移 24h 后,移去纸巾,胶面朝上标记点样孔的位置,用 0.5mol/L Tris(pH7.0)中和尼龙膜 5min,然后在 2×SSC 中简单漂洗一下。将膜放于滤纸上空气干燥,用滤纸包裹,室温保存。使用 Random Primers DNA labeling System 试剂盒标记 *EIF5A2* cDNA 和 *DHFR* cDNA 探针,并用 Bio101 Quick Spin Columns 纯化标记好的探针,均按说明书推荐的方法进行操作。

将转印好的尼龙膜装入杂交管中,加入预杂交液(6×SSC,5×Denhardt's 溶液,0.5% SDS,50% 去离子甲酰胺,100μg/mL 变性的鲑鱼精 DNA),42℃ 预杂交 3h。加入变性的探针,42℃ 杂交过夜。杂交后的滤膜于 45℃ 用 2×SSC 0.1% SDS 洗两次,每次 10min;然后在 55℃ 用 0.2×SSC 0.1% SDS 洗两次,每次 10min。沥干洗液,用保鲜膜包好,-80℃

放射自显影 24 ~ 48h。

2 结果

2.1 人卵巢癌细胞系 UACC-1598 细胞中的 DMs 的大小检测: 收获对数生长期的细胞, 用低熔点琼脂糖包埋以获得完整的高相对分子质量 DNA 片段。包埋于琼脂糖胶块中的 UACC-1598 细胞除去蛋白后, 经 40Gy 的 X 射线照射或用 *Not I* 部分酶切使 DMs 线性化。然后用分离 1.0 ~ 3.2Mb DNA 片段的电泳条件, 在 CHEF 电泳中分离大片的线性 DNA 分子。将分离后的 DNA 转移至尼龙膜, 与 *EIF5A2* 基因的特异性探针杂交。Southern 印迹杂交的结果显示, X 射线处理及 *Not I* 酶切 60min 的细胞均产生了长度约为 2.8Mb、2.1Mb 及 1.4Mb 的条带(见图 1B), 表明 UACC-1598 中存在大小约为 2.8Mb、2.1Mb 及 1.4Mb 的 DMs 群体。在 *Not I* 酶切 60min 的细胞中, 除这三条杂交带外, 还有一系列相对分子质量较小的片段, 应为不完全消化的产物。此外, 经 X 射线照射的样品(X)和 *Not I* 消化 30min 的样品(N_1) 在胶的下端有脱尾样弥散带, 而 *Not I* 消化 60min 的样品(N_2) 中没有, 表明它们可能是 DMs 非特异性降解产生的小片段 DNA。

2.2 MTX 抗性细胞中 DMs 的大小检测: 为分析 MTX 抗性细胞中 DMs 的大小, 首先用 40Gy 的 X 射线处理的包埋有细胞的胶块使 DMs 线性化, 然后在分离 100kb ~ 2.2Mb DNA 的电泳条件下进行 CHEF 电泳, 分离高相对分子质量的线性 DNA 片段并转移至尼龙膜, 与 *DHFR* cDNA 探针进行杂交。Southern 印迹杂交的结果显示: 对照 3T3R500 细胞中无可见的杂交信号, 而 MTX100、MTX400 细胞中存在约为 1.4Mb 的杂交条带(见图 2A), 表明这些 MTX 抗性细胞中存在约为 1.4Mb 的 DMs 群体。在 MTX500 细胞中虽未出现特异性的杂交带, 但点样孔处有很强的杂交信号, 表明大量的扩增片段滞留于点样孔中, 未被有效分离。而且 MTX100、MTX400、MTX500 的压缩区和点样孔内均存在较强的杂交信号, 提示 MTX 抗性细胞中可能还存在更大的 DMs 群体。

为证实上述推测, 用 *Sac II* 部分消化的方式进行 DMs 的线性化处理, 并在分离 1.0 ~ 3.2Mb DNA 的条件下进行电泳。Southern 印迹杂交结果显示, 在 MTX100 及 MTX500 细胞中均存在 2.5Mb 的优势群体, 但 MTX500 细胞中杂交信号的强度明显高于 MTX100 细胞(见图 2B)。

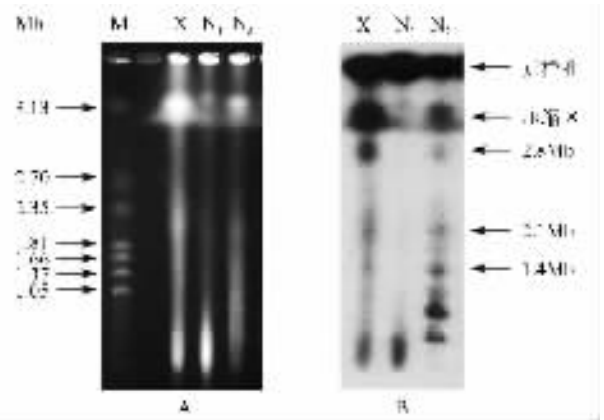


图 1 UACC-1598 细胞中 DMs 的大小分析
Fig. 1 Detection of DMs in UACC-1598 cells

A: UACC-1598 细胞中 DMs 的 CHEF 电泳分离结果; B: Southern 印迹杂交结果; CHEF 条件为 0.8% 琼脂糖, 1.0 × TAE, 14°C, 3V/cm, 夹角 106°, 500s 电泳 48h, marker 为 *H. wingei*。X: X 射线处理; N_1 : *Not I* 消化 30min; N_2 : *Not I* 消化 60min。
A: Separation of DMs with CHEF; B: Southern blotting hybridization of DMs with *EIF5A2* probe. Linearized circular DMs were separated on a 0.8% agarose gel in 1.0 × TAE in a CHEF apparatus, re-circulated at 14°C. The run time was 48h at 3V/cm with 500s switch time ramp at an included angle of 106°. *H. wingei* was used as DNA size marker. X indicates DMs linearized with X ray; N_1 indicates DMs linearized with *Not I* digestion for 30 min; N_2 indicates DMs linearized with *Not I* digestion for 60 min.

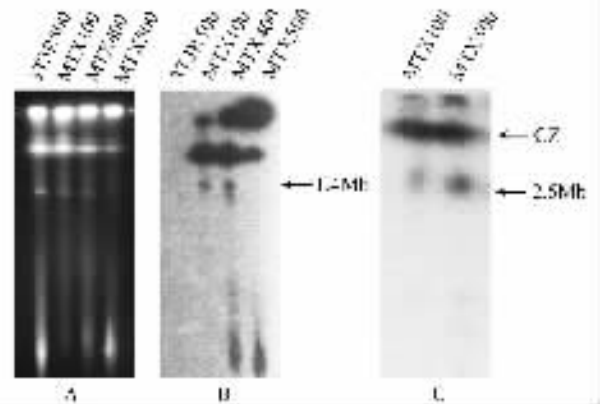


图 2 MTX 抗性细胞中 DMs 片段的大小分析
Fig. 2 Detection of DMs in MTX-resistant cells

A: EB 染色的 CHEF 胶; B-C: 为 Southern 印迹杂交结果; A-B: CHEF 的条件为 0.8% 琼脂糖, 0.5 × TBE, 6V/cm, 14°C, 夹角 120°, 70s-15h 接 120s-11h, marker 为 *Saccharomyces cerevisiae*。C: CHEF 条件为 0.8% 琼脂糖, 1.0 × TAE, 14°C, 夹角 120°, 500s-36h 接 6V/cm, 夹角 120°, 120s-9h, marker 为 *H. wingei*。CZ 代表压缩区。
A: Separation of DMs with CHEF; B-C: Southern hybridization of DMs with *DHFR* probe; A-B: Linearized circular DMs were separated on a 0.8% agarose gel in 0.5 × TBE with a 70s switch time for 15h, followed by a 120s switch time for 11h ramp at an included angle of 120°, at 6V/cm, re-circulated at 14°C in a CHEF apparatus, *Saccharomyces cerevisiae* was used as DNA size marker; C: Linearized circular DMs were separated on a 0.8% agarose gel in 1.0 × TAE with a 500s switch time for 36h, followed by a 120s switch time for 9h ramp at an included angle of 120° at 6V/cm, re-circulated at 14°C in a CHEF apparatus, *H. wingei* was used as DNA size marker, CZ denotes compress zone.

3 讨论

本研究采用了两种富含 DMs 的细胞系进行 DMs 大小的研究,其中人卵巢癌细胞 UACC-1598 中自发地含有大量 DMs,携带扩增的原癌基因;而起源于小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 的 3T3R500 细胞可在体外用 MTX 筛选,诱导出大量的 DMs,与细胞的耐药程度密切相关,因此这两种细胞中扩增的基因代表了肿瘤病人中最常见的两大类扩增基因。与已建系的肿瘤细胞相比,体外诱导的抗性细胞在研究基因扩增的机制方面,特别是在鉴定基因扩增的起始事件及扩增子的演化中具有独特优势。因此以这两种细胞为材料进行 DMs 研究不仅具有一定的互补性,同时也具有更加广泛的代表性。

作为一种常见的基因扩增的细胞遗传学结构,光镜下可见的 DMs 大小通常在 1Mb 以上,这一尺度超过了常规的分子生物学方法分辨率的上限。1984 年, Schwartz 等^[12]建立的 PFGE 技术,成功地使 DNA 分离上限跃迁到 2 Mb。在目前使用的 PFGE 的装置中,箝位匀强电场(contour-clamped homogeneous electric field, CHEF)是用途最广的一种,可以分离高达 10 Mb 大小的 DNA 分子^[13],这一独具的高分辨率使 CHEF 成为分离、分析 DMs,鉴定其大小、结构的理想工具。

以往的研究提示 DMs 是一种环状的 DNA 分子^[14~16]。环状 DNA 分子在 PFGE 电泳中无法迁移,因此为检测完整的 DMs 线性分子的大小,首先要在 DMs 环状 DNA 分子上引入单一的缺口(DS-Bs),使之线性化,再以 CHEF 技术结合 Southern 印迹进行分析。通常,可以选择一些在 DMs DNA 分子中具有罕见切点的酶,用部分消化的方法使 DMs DNA 分子线性化。例如, *Not I* 切割人类 DNA 的频率极低,平均每 10Mb 才有一个切点。但用稀有性内切酶消化的缺点是酶在胶块中不能均匀分布。X 射线在胶块中分布均匀,对胶块进行 X 射线照射成为大片段 DNA 分子线性化的一个简便方法,但此方法的局限性在于其产量较低。

结合 CHEF 与 Southern 印迹,本研究在 UACC-1598 细胞中检测到约 2.8Mb、2.1Mb 和 1.4Mb 的

DMs 群体,目前还不能排除该细胞中存在更大 DMs 的可能。此外,我们前期工作中对于 DMs 中扩增子的大小研究,已经揭示该细胞中存在约 300kb 及 400kb 的两个基本扩增子,其中含有两个已知的原癌基因(待发表结果)。用 *Not I* 完全消化的胶块与这两个基因特异性的探针杂交均可产生几百 kb 的杂交带(结果未显示),提示 DMs 由多拷贝的扩增子组成。进一步用这两个扩增子特异性的探针进一步进行 Fiber-FISH 分析将有助于揭示 DMs 中扩增子的排列方式。

与 UACC-1598 细胞相似,在 MTX 抗性细胞 MTX100、MTX400 及 MTX500 细胞中也检测到 2.5Mb 及 1.4Mb 的 DMs 群体。显示两种细胞中的 DMs 均存在一定的异质性,这与以往的一些研究结果相似^[17,18]。同一类型的细胞中存在异质性的 DMs 群体,可能反映这些细胞的基因组处于一种不稳定的状态,或者由于细胞传代过程中 DMs 不断发生演化,某种类型的 DMs 由于更具有选择优势而最终被保留下来。

以往的一些研究提示,最初形成的 DMs 通常只含有单一的扩增子,随着培养时间的延长,DMs 倾向于形成二聚体或多聚体^[19,20]。本研究结果显示 MTX100 细胞中的优势 DMs 群体为 1.4Mb,而 MTX500 细胞中 2.5Mb 的 DMs 群体占优势,提示随着 MTX 抗性的增强,最初形成扩增子结构趋向于寡聚化或多聚化形成较大片段的 DMs。

一般认为,染色体外扩增结构在扩增早期占优势,而染色体上的扩增结构在扩增晚期占优势。有研究显示,染色体外的扩增结构可以整合入染色体,成为相对稳定的基因扩增结构^[21~23],但我们用 DMs 特异性探针进行 FISH 杂交的结果显示,MTX500 细胞及 UACC-1598 细胞中均不存在整合于染色体的扩增区(待发表结果),显示这些细胞中染色体外的扩增结构未随抗药性的增强而整合于染色体成为相对稳定的扩增结构,这与 3T3R500 细胞 MTX 抗性的不稳定性相一致,但目前尚无法解释 UACC-1598 细胞中的 DMs 在长期传代中可稳定存在的现象。Pauletta 等^[24]曾报道在 MTX 抗性的 HeLa 细胞中检测到 650kb 的环状 DNA 分子,在研究过程中这些分

子并无增大或整合入染色体的趋势。上述结果提示,不同的细胞背景下 DMs 可能存在不同的演化模式,一些细胞中 DMs 稳定存在的机制也有待深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991 64 :235 - 248.
- 2 Brison O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1993 1155 :25 - 41.
- 3 Duffy MJ. Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer. *Clin Biochem*, 1993 26 :439 - 447.
- 4 Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*, 1999 9 :319 - 325.
- 5 Benner SE, Wahl GM, von Hoff DD. Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines. *Anticancer Drugs*, 1991 2 :11 - 25.
- 6 Hamlin JL, Leu TH, Vaughn JP, *et al.* Amplification of DNA sequences in mammalian cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1991, 41 :203 - 239.
- 7 Kuo MT, Vyas RC, Jiang LX, *et al.* Chromosome breakage at a major fragile site associated with P - glycoprotein gene amplification in multidrug-resistant CHO cells. *Mol Cell Biol*, 1994, 14 :5202 - 5011.
- 8 Poupon MF, Smith KA, Chernova OB, *et al.* Inefficient growth arrest in response to dNTP starvation stimulates gene amplification through bridge-breakage-fusion cycles. *Mol Biol Cell*, 1996 7 :345 - 354.
- 9 Schimke RT. Gene amplification in cultured cells. *J Biol Chem*, 1988 263 :5989 - 5992.
- 10 Smith KA, Stark MB, Gorman PA, *et al.* Fusions near telomeres occur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992 89 :5427 - 5431.
- 11 Stark GR. Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv Cancer Res*, 1993 61 :87 - 113.
- 12 Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 1984 37 :67 - 75.
- 13 Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 1986, 234 :1582 - 1585.
- 14 Hamkalo BA, Farnham PJ, Johnston R, *et al.* Ultrastructural features of minute chromosomes in a methotrexate-resistant mouse 3T3 cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985 82 :1026 - 1030.
- 15 Ruiz JC, Choi KH, von Hoff DD, *et al.* Autonomously replicating episomes contain *mdr1* genes in a multidrug-resistant human cell line. *Mol Cell Biol*, 1989 9 :109 - 115.
- 16 van der Blik AM, Lincke CR, Borst P. Circular DNA of 3T6R50 double minute chromosomes. *Nucleic Acids Res*, 1988 16 :4841 - 4851.
- 17 Hahn P, Nevaldine B, Morgan WF. X-ray induction of methotrexate resistance due to *dhfr* gene amplification. *Somat Cell Mol Genet*, 1990 16 :413 - 423.
- 18 Hahn PJ, Nevaldine B, Longo JA. Molecular structure and evolution of double-minute chromosomes in methotrexate-resistant cultured mouse cells. *Mol Cell Biol*, 1992 12 :2911 - 2918.
- 19 Rizwana R, Hahn PJ. CpG islands and double-minute chromosomes. *Genomics*, 1998 51 :207 - 215.
- 20 Schoenlein PV, Shen DW, Barrett JT, *et al.* Double minute chromosomes carrying the human multidrug resistance 1 and 2 genes are generated from the dimerization of submicroscopic circular DNAs in colchicine-selected KB carcinoma cells. *Mol Biol Cell*, 1992 3 :507 - 520.
- 21 Trask BJ, Hamlin JL. Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *Genes Dev*, 1989 3 :1913 - 1925.
- 22 Windle BE, Wahl GM. Molecular dissection of mammalian gene amplification: new mechanistic insights revealed by analyses of very early events. *Mutat Res*, 1992 276 :199 - 224.
- 23 Coquelle A, Toledo F, Stern S, *et al.* A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell*, 1998 2 :259 - 265.
- 24 Pauletti G, Lai E, Attardi G. Early appearance and long-term persistence of the submicroscopic extrachromosomal elements (ampisomes) containing the amplified *DHFR* genes in human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990 87 :2955 - 2959.

(收稿日期 2006-04-04)

(本文编辑 高巍)