

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.05.07

Lewis 肺癌的 RAPD 分析及其差异片段克隆

李淑蓉 陈意生 魏泓

【摘要】 目的 检测 Lewis 肺癌的遗传改变,寻找与癌变相关的 DNA 序列或片段。方法 用 105 条引物对 Lewis 肺癌及其来源小鼠 C57BL/6J 正常组织基因组 DNA 进行随机扩增多态 DNA(RAPD)扩增,比较肿瘤组织与正常组织的扩增图,对差异很明显的片段回收、克隆和测序,序列与 GenBank 数据库进行同源性比较。结果 105 条引物中有 25 条引物扩增出的条带在肿瘤组织与其相应正常组织间存在差异。引物 AB7-2 和 AB7-11 扩增所得差异片段 L7-2 和 L7-11 回收纯化后克隆测序。L7-2 片段长 730 bp,该序列与已知序列没有任何相关性。L7-11 长 779 bp,与小鼠的 V kappa 21-11 gene 在核酸水平具有 90% 的同源性。结论 本研究用 RAPD 技术检测出 Lewis 肺癌存在一定程度的遗传改变,并发现与 Lewis 肺癌发生相关的 DNA 序列 L7-2 和 L7-11,这种改变可能与肺癌的发生相关。

【关键词】 肺肿瘤 遗传改变 RAPD 克隆 测序

【中图分类号】 R734.2

Analysis on genetic alterations of Lewis lung cancer by RAPD and cloning of tumor-differential DNA fragment LI Shurong, CHEN Yisheng, WEI Hong. Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P, R, China

【Abstract】 Objective To detect the genetic alterations and to find the tumor-related DNA fragments in Lewis lung cancer. **Methods** Genomic DNAs from Lewis lung cancer and C57BL/6J mouse normal tissues were amplified by random amplified polymorphic DNA(RAPD) with 105 10-bp random primers. The RAPD bands showing obvious difference in tumor tissue DNA corresponding to that of normal tissue were cloned and sequenced. DNA sequences were analyzed and compared with GenBank data. **Results** There were 25 abnormal profiles out of the 105 primers generated polymorphic profile when the Lewis lung cancer RAPD profile was compared to that of its normal tissue DNA. The tumor-differential fragments L7-2 and L7-11 were obtained with primer AB7-2 and AB7-11 respectively. DNA sequence analysis revealed that L7-2 was a 730 bp fragment, and its sequence did not show significant homologies with known DNA sequences. L7-11 was a 779 bp fragment, and its sequence shared 90% homology with mouse V kappa 21-11 gene. **Conclusion** Genetic alterations in Lewis lung cancer genomic DNA have been detected by RAPD, and tumor-related DNA fragments L7-2 and L7-11 have been found in this study, which may be associated with tumorigenesis of Lewis lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Genetic alteration RAPD Cloning sequencing

This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China(to WEI Hong)(No. 39900173).

肿瘤发生是多种遗传改变积累的结果,基因组不稳定性增高是遗传改变的主要方式之一,其直接结果是基因组损伤。随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术可检测基因组 DNA 的细微改变,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。随机引物法亦已用于检测大肠癌、卵巢癌、肺癌、皮肤癌等的基因组不

稳定性及分离差异 DNA 片段,并将其克隆定位^[1-3]。为探讨肺癌发生的机理,本研究对 Lewis 肺癌细胞株及其来源小鼠 C57BL/6J 正常组织基因组进行 RAPD 分析,比较肿瘤组织与正常组织的 DNA 指纹,了解基因组不稳定与肿瘤发生的关系;对差异明显且重复性好的部分片段克隆和测序,以期发现与肿瘤发生相关的 DNA 序列或片段,进一步了解肿瘤发生的机理。

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。将瘤细胞接种于 C57BL/6J 小鼠右胸腹

本研究受国家自然科学基金(39900173)资助

作者单位 400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所(李淑蓉、陈意生);第三军医大学实验动物中心(魏泓,文稿联系人)

侧皮下,待瘤块大小达 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 C57BL/6J 小鼠肝脏备用。

1.2 试剂与引物 Taq 酶、dNTP(德国 BM 公司),随机引物(美国 Operon 公司,10bp)为 AB-0320-kit2、AB-0320-kit3、AB-0320-kit4、AB-0320-kit6、AB-0320-kit7 五套引物及 AB-0320-kit8(5、12、16 号)、AB-0320-kit9(6、7 号)共 105 条引物。T4 连接酶、pGEM®-T Easy Vector(美国 Promega 公司),JM109(Promega),高纯度质粒分离试剂盒(美国 Boehringer Mannheim Corp.)

1.3 基因组 DNA 的提取 瘤组织块及 C57BL/6J 小鼠正常组织加少许液氮研碎,按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,其中含 2.5 μl 10× buffer,2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,2 μmol/L 引物,25~50 ng 模板 DNA, TaqDNA 聚合酶 1.5 单位。反应程序为,94℃ 预变性 2 分钟,94℃ 变性 1 分钟,38℃ 复性 1 分钟,72℃ 延伸 2 分钟,40 个循环后,72℃ 延伸 10 分钟。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。

1.5 差异 DNA 片段的回收及重扩增 参照《分子克隆实验指南》^[4]“从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA”的方法,稍作修改。取 2 μl 回收的 DNA 片段作模板,用与选择扩增相同的条件(只是最后延伸 72℃ 20 分钟)扩增,在琼脂糖凝胶上确证后纯化回收,再验证。直接用于克隆。

1.6 PCR 产物的克隆与鉴定

1.6.1 差异 DNA 片段与载体的连接及转化 加 T 的载体为 pGEM®-T Easy Vector,连接反应按试剂盒说明书进行。连接产物转化入 JM109 感受态细胞,取转化菌液加 X-gal 和 IPTG 混匀,转移到氨苄青霉素抗性培养基上涂盘,37℃ 倒置培养 8~10 小时,4℃ 避光显色。

1.6.2 Lewis 肺癌阳性克隆的筛选及验证 用 X-gal 平板对克隆进行初步筛选。在 X-gal 平板上显示为白色的菌落为阳性克隆,蓝色菌落为阴性克隆。对白色菌落仍需进一步验证,用碱裂解后直接进行琼脂糖电泳,含有外源片段的质粒将出现滞后现象,质粒 DNA 有滞后现象的菌落,立即用试剂盒高纯度质粒分离试剂盒提取质粒,与正常质粒和外源 DNA 片段同时用 EcoRI 进行酶切,进一步验证外源片段的插入。

1.6.3 差异 DNA 片段的序列分析与同源性比较 将差异 DNA 片段与 pGEM®-T Easy Vector 载体体外重组

后,用军事医学科学院 ABI377 型全自动测序仪测序,序列与 GenBank 数据库中的 DNA 序列进行同源性比较。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果 Lewis 肺癌来源于 C57BL/6J 小鼠,因此可以比较 Lewis 肺癌移植瘤基因组 DNA 与正常 C57BL/6J 小鼠肝组织基因组 DNA 的 RAPD 扩增图。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(图 1 的 1LC、2LC、3LC、4LC)。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,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。引物 AB7-11 扩增出的条带在约 800 bp 位置,肿瘤组织与其相应正常组织相比,表现为带强度明显降低(图 1);引物 AB7-2 扩增后,肿瘤组织带强度增加(图 2)。

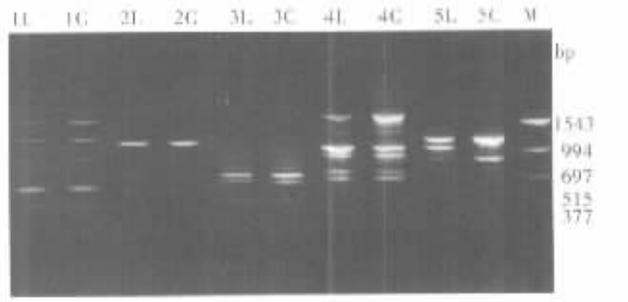


图 1 RAPD 扩增电泳图

1LC、2LC、3LC、4LC 呈单态性;引物 AB7-11 扩增后带强度明显减弱(5LC)。(L: Lewis 肺癌;C: C57BL/6J;M: Marker)

Fig 1 Electrophoresis of RAPD amplification

Monomorphic band pattern in 1LC, 2LC, 3LC, 4LC; decreased band intensity in 5LC with primer AB7-11. (L: Lewis lung cancer; C: C57BL/6J; M: Marker)

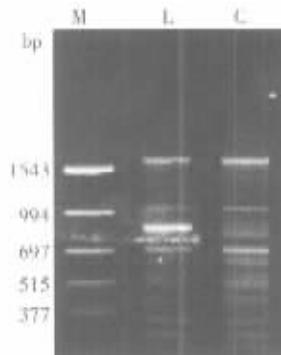


图 2 引物 AB7-2 扩增后电泳图(带强度增加)

Fig 2 Electrophoresis of RAPD amplification with primer AB7-2 (Increased band intensity)

2.2 差异 RAPD 片段的回收、纯化和克隆 对 RAPD 扩增中差异很明显、稳定性、重复性好的 7 个 DNA 片

段进行低熔点琼脂糖凝胶回收、纯化和克隆测序。经引物 AB7-11 和 AB7-2 扩增后所得差异片段 L7-11 和 L7-2, 克隆到 pGEM® -T Easy Vector。

2.3 差异 DNA 片段的序列分析 L7-2 和 L7-11 片段由 AB I 377 型全自动测序仪测序分析, 测序时分别采用 T7 引物和 SP6 引物从多克隆位点两侧测序(即每个克隆测序两次), 并经 Unix 下的软件分析, 获得此两个克隆的插入片段全长序列。将这两个片段与 GenBank 序列数据库进行同源性分析。L7-2 片段长 730 bp, 未发现任何同源性信息, 即该序列和已知序列没有任何相关性, 可能对应一个全新的基因。L7-11 长 779 bp, 与小鼠的 V kappa 21-11 gene 在核酸水平具有 90% 的同源性。它们的序列如下:

L7-2 (730 bp)

```
TCTGAACCGCTAATCAGGGCTGTGTAGAGCGGGAGGACTCTGTGGCCAC
CAGAGTACTGACTGTTTGGGTTCAAGCTAGTTTTGAGAGTAGAAGAGG
AAACGCTGTGATCAGGTGGCAGATGATGGGATAGAGATGTCCTACGATT
CCTGACACAGACGTTCTTTTAAAAATAAAAGTATTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGGCTTGTATTTGAGTACAAGTGCCACAGAGCCAGAA
GAGGGGCATCTGACTCCCTGGAGCTGGAGCTGGCCTTACAGCCAGCTGTG
AGCTATAGGATGTGGGTCTGGAAGCTGAACACTTGTCTCTGGAAGGGC
TGCAGGACATGATCAGCTTCTGAGCCATGTCTCCAGTCCAGAACCTTTTT
TCTTAATTGTGTAAGTCCAGGTTGCTACTGATGGTGGTGGCTGTCC
TCCAAGGGAGTCTGGGATTGCACTCCCATTTGTGTGTGATCCCTGACG
TGCTACTGGAAGGCACTGGCCTCATGTCTAGCCGCTGGAGTGTAGGCTT
AGATTTTTCAAACCTAATTTGATTAATGTTCTTTAACACACCAACCTCC
CTTCTAGCCACCTACCAGAGGTAGAGGAAGAGAAGGTTAATAGGAAAT
GGGCTGTGGATCTCTGTAGAAGTAGTTCTTTGGGGAGATACAATGCAG
TCATTTGTGTCAGGATATCAGCGGTTTCAGA
```

L7-11 (779 bp)

```
TCTGAACCGCTTCTATTGGATGGGAAATAGTTGTATGAATTCAGGCATCT
AAAAGACAAATTGTAAGGGAACATCTGTCTGTGTCCAGACAATTCAAAGA
CAACTTTCCATCCTATTGTAATTGTCAATCTAAGACCATGTTTCTAGGC
CTAGGAATATACTCCTAATTTCTGATAGCTGGAAATCCCTTGCTCAACTCA
TTATGTCAAATAAAATTCGATAACTGCTGTGGATAGCCCTGGGCTAAT
TATATTTGAGGTTAATTCATTCCTCCCTGACTGGTTGAGAACAAGGAATG
AGTCAGCACTCAGGTGATTTCTGTGTAACCTGCTTCCACCTTAATTTGT
AAAATAAAGGAGAGCTGATGACTAGTATGATAAAAGAGAAGGTGGAGCCG
AAAGTGGGAGAGACGAATAAGGAGAAAATGAAGAGGAGTGAAGACCC
CACAGCGTGAGACTCCCCACATTTCTGACTCAGGAAAGGTGACACCCCA
AATCACTCATAAGAAATGGTCTGTGCTGCAAACTGCAAGAGGACTTTTTAT
TTCAAGAGCACTCTCAGGCCACAGTCATACACCAGCTAGGGGTAGAGGA
CCATGGTCCCAAGTAGCTGGGTAAGGGGTAATTTAAAGGAAGAAACCAC
AACTCAAGGGGGTGGGAAGGGTGTGTTAAAAATAACAAAAATACCACT
TAAGAGTCACAAGGAAGTGGAAAGTCAAGACAGTTTTCTAGGAGCCTCTA
ACAGTAGCACTCTGCCTAGCGGTTTCAGA
```

3 讨论

近年来人们用随机引物法对一些肿瘤样本进行了

研究。Ong 等^[1]用 7 条随机引物检测肺癌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了基因组不稳定性, 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一种较灵敏可靠的方法。Dil-Afroze 等^[2]用 RAPD 技术检测脑肿瘤, 29 条引物用于 7 例脑膜瘤, 所有肿瘤组织都有 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。我们先前也用 RAPD 方法证明非小细胞肺癌中存在较高频率的遗传改变^[3]。本研究应用 RAPD 方法对 Lewis 肺癌的整个基因组进行扫描, 检测到肺癌基因组有一定程度的改变。所用 105 条引物中有 25 条引物的扩增产物在 Lewis 肺癌及其正常组织间呈现多态性, 表明 Lewis 肺癌与正常组织基因组 DNA 之间存在差异, 即肿瘤基因组 DNA 的损伤, 其结果与人体肿瘤的相似, 证明 Lewis 肺癌发生与遗传改变积累相关。

肿瘤中差异基因(或 DNA 序列)的分离、鉴定是一项极其艰苦的工作, 以往多采用消减杂交或差异杂交的方法。与消减杂交方法不同的是, 随机引物法可以同时显示两个基因组的差异情况。例如在对与肿瘤发生有关的基因进行分离时, 应用随机引物法可以同时分离出只在正常组织表达的基因(肿瘤抑制基因候选基因)或在肿瘤细胞特异表达的基因(癌基因候选基因)。将这些差异片段从凝胶上切下后, 可再用相同的引物扩增, 扩增片段经纯化, 选择适当的载体进行连接, 就可以得到差异基因片段克隆。应用此方法, Peinado 等^[5]用随机引物法检测分离到大肠癌中的两个差异 DNA 片段, 克隆、测序并将其定位于 17 号染色体短臂。Liang 等^[6]应用这种方法鉴别了正常 A31 和肿瘤起源的 BPA31 细胞, 分离到了仅存在于正常细胞的 N1 及仅存在于肿瘤细胞的 T1 片段。De Juan 等^[7]从非小细胞肺癌中分离了一个扩增片段, 此片段与已知人类核酸序列无明显同源性, 认为可能是一个新基因。这些研究为发现和寻找新的癌基因和肿瘤抑制基因提供了简便可行的方法, 发现了一些与肿瘤发生和转移相关的新的 DNA 序列或基因, 进一步了解了肿瘤发生发展的分子机理。

本研究共获得 2 个差异片段的 DNA 序列。Lewis 肺癌的 L7-2 片段长 730 bp, 通过 GenBank 数据库分析, 未发现任何同源性信息, 即该序列和已知序列没有任何相关性, 可能对应一个新的基因。L7-11 长 779 bp, 与小鼠的 V kappa 21-11 gene 在核酸水平具有 90% 的同源性。V kappa 21-11 gene 为 V kappa 多基因家族的成员之一, V kappa 基因是免疫球蛋白 kappa 轻链 V 区

基因,可分为三个单源族。该基因与肿瘤的关系未见报道,其功能意义有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Ong TM, Song B, Qian HW, et al. Detection of genomic instability in lung cancer tissue by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis*, 1998, 19(1):233-235.
- 2 Dil-Afroze, Misra A, Sulaiman IM, et al. Genetic alteration in brain tumors identified by RAPD analysis. *Gene*, 1998, 206(1):45-48.
- 3 李淑蓉, 陈意生, 魏泓. 非小细胞肺癌的随机扩增多态 DNA 分析. 第三军医大学学报, 2000, 22(1):36-38.
- 4 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1992. 322.

- 5 Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, et al. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21):10065-10069.
- 6 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257(5072):967-971.
- 7 De Juan C, Iniesta P, Cruces J, et al. DNA amplification on chromosome 6p12 in non small cell lung cancer detected by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, 1999, 84(4):344-349.

(收稿 2000-09-04 修回 2000-12-17)
(本文编辑 张世雯)

· 短篇报道 ·

吉西他滨联合顺铂治疗中晚期 NSCLC 17 例近期疗效观察

姚文秀 罗卫华 王更利 陈萍 赵新 陈益

【中图分类号】 R734.2 ;R730.53

1999 年 10 月至 2000 年 9 月我院采用吉西他滨(GEM)顺铂(DDP)联合方案治疗中晚期非小细胞肺癌(NSCLC)17 例,现将结果报告如下。

临床资料 17 例患者均为经病理或细胞学证实的不能手术的中晚期 NSCLC,且完成 2 周期以上化疗。其中男性 14 例,女性 3 例,年龄 39~72 岁,中位年龄 58.3 岁,腺癌 10 例,鳞癌 4 例,腺鳞癌 1 例,未分型 2 例;初治者 3 例,复治者 14 例;ⅢA 期 3 例,ⅢB 期 4 例,Ⅳ期 10 例。KPS 评分均大于或等于 60 分,肝、肾功能正常。治疗方法:GEM 1.0 g/m²,静注,第 1、8 天;DDP 40~60 mg,静滴,第 1~3 天(适当水化,输液 2 000~2 500 ml/d),21 天为 1 周期,治疗至少 2 周期。疗效及毒副反应评定按 WHO 标准进行。疗效分完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),毒性分为 0~Ⅳ度。

结果 17 例患者中,CR 1 例(ⅢB 期,初治),PR 7 例(ⅢA 期 2 例,ⅢB 期 1 例,Ⅳ期 4 例;初治 1 例,复治 6 例),SD 7 例(ⅢA 期 1 例,ⅢB 期 2 例,Ⅳ期 4 例;初治 1 例,复治 6 例),PD 2 例(Ⅳ期、复治),总有效率为 47.1%。主要毒性反应是骨髓抑制,白细胞下降率为 82.4%(14/17),其

中Ⅲ~Ⅳ度占 29.4%(5/17),白细胞降至最低点时间为治疗后第 7~14 天;血小板、色素下降率分别为 17.6%(3/17)和 11.8%(2/17),无Ⅳ度下降者。其他副反应包括恶心、呕吐 9 例(Ⅲ~Ⅳ度 3 例),发生率为 52.9%;Ⅰ~Ⅱ度便秘 5 例(29.4%);1 例出现转氨酶Ⅱ度升高;1 例出现血尿素氮Ⅰ度升高,未经特殊处理,自行恢复正常。全组无治疗相关死亡。

讨论 GEM 是阿糖胞苷的类似物,其在体内的代谢产物二磷酸及三磷酸双氟脱氧胞嘧啶核苷为主要活性产物,通过插入 DNA,使 DNA 合成中断。由于其良好的膜穿透性,与脱氧胞苷激活酶更强的亲和力以及细胞内更长的留滞时间,GEM 具有较阿糖胞苷更强的抗癌活性。单药治疗晚期 NSCLC 的有效率为 19%~27%^[1,2]。GEM 和 DDP 在体内外均有协同作用。文献报告 GEM 和 DDP 联合化疗有效率为 35%~54%^[3-6]。本组总有效率为 47.1%,与文献报道一致。从既往治疗、临床分期看疗效,本组初治者较复治者好,ⅢA 期较ⅢB 期及Ⅳ期高,ⅢB 期较Ⅳ期好,但因病例偏少,有待于进一步临床观察。此方案的主要毒副反应为骨髓抑制,白细胞下降率为 82.4%,其中Ⅲ~Ⅳ度占 29.4%。经用集落刺激因子升高白细胞及支持治疗后可很快恢复,不影响治疗计划,其他毒性反应包括恶心、呕吐、便秘,肝、肾功能损害少见,一般不需特殊处理,可自行恢

复正常。综上所述,GEM 联合 DDP 方案治疗中晚期 NSCLC 疗效较好,毒副反应可耐受,值得临床推广和应用。

参 考 文 献

- 1 Shepherd FA. Chemotherapy for non-small cell lung cancer have we reached a new plateau. *Semin Oncol*, 1999, 26(1 Suppl 4):3-11.
- 2 Perng RP, Chen YM, Ming-Liu J, et al. Gemcitabine versus the combination of cisplatin and etoposide in patients with inoperable non-small-cell lung cancer in phase II randomized study. *J Clin Oncol*, 1997, 15(5):2097-2102.
- 3 Crino L, Scagliotti G, Marangolo M, et al. Cisplatin-gemcitabine combination in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *J Clin Oncol*, 1997, 15(1):297-303.
- 4 Rosell R, Tonato M, Sandler A, et al. The activity of gemcitabine plus cisplatin in randomized trials in untreated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, 1998, 25(4 Suppl 9):27-34.
- 5 Bunn PA Jr. Triplet chemotherapy with gemcitabine, a platinum, and a third agent in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, 1999, 26(1 Suppl 4):25-30.
- 6 方健, 刘叙仪. 吉西他滨联合顺铂治疗 16 例Ⅲ/Ⅳ期非小细胞肺癌. *中国癌症杂志*, 2000, 10(1):75-80.

(收稿 2000-11-01 修回 2001-02-14)
(本文编辑 张世雯)

作者单位 610041 成都,四川省肿瘤医院内科(姚文秀、王更利、陈萍、赵新、陈益);核工业部 363 医院肿瘤科(罗卫华)