

小鼠口腔癌模型骨髓播散细胞 RB1CC1 纯合性缺失的初步研究

施 强, 牟 云, 于大海, 黎明武, 卿海云, 李 晶

基金项目: 广西硕士研究生科研创新项目(编号:YCSZ2014111); 广西自然科学基金资助项目(编号:2013GXNSFAA019182)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

作者简介: 施 强(1985-), 男, 硕士在读, 住院医师, 研究方向: 口腔癌淋巴道转移模型。E-mail: 460018640@qq.com

通讯作者: 于大海(1968-), 男, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 口腔癌淋巴道转移机制。E-mail: yudahai813@aliyun.com

[摘要] 目的 初步探讨小鼠口腔癌模型重度异常增生时期骨髓播散细胞 RB1CC1 基因纯合性缺失及其意义。方法 应用激光捕获显微切割(LCM)技术捕获 35 张重度异常增生时期小鼠骨髓单个核细胞涂片的单个细胞角蛋白阳性(CK+)细胞, 单细胞全基因组扩增技术(WGA)扩增其 DNA, PCR 检测其视网膜母细胞瘤诱导卷曲蛋白(RB1CC1)的纯合性缺失情况, 并与舌部正常、重度异常增生以及鳞癌组织各 4 例对照。结果 LCM 成功捕获 CK+ 细胞 35 个, WGA 成功扩增 3 个, RB1CC1 纯合性缺失情况分别为单个 CK+ 细胞(2/3), 舌癌变组织(2/4), 舌部正常组织(0/4), 重度异常增生组织(0/4)。结论 小鼠口腔癌模型重度异常增生时期骨髓 CK+ 细胞有 RB1CC1 基因纯合性缺失, 该时期骨髓 CK+ 细胞可能是播散肿瘤细胞。

[关键词] 小鼠; 播散肿瘤细胞; 激光捕获显微切割(LCM); RB1CC1; 纯合性缺失

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)05-0394-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.05.03

Preliminary observation of homozygous deletions of RB1CC1 gene in disseminated cells of bone marrow of mouse oral carcinoma model SHI Qiang, MU Yun, YU Da-hai, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To observe the homozygous deletions of RB1CC1 gene of disseminated cells in bone marrow of mouse oral carcinoma model in the severe abnormal hyperplasia stage. **Methods** The cytokeratin positive (CK+) cells from 35 single nuclear cells smear of bone marrow of mouse oral carcinoma model in the severe abnormal hyperplasia stage were isolated by Laser Capture Microdissection (LCM). The DNA of a single cell was amplified by the technique of single-cell Whole Genome Amplification (WGA) and the homozygous deletions of RB1CC1 gene of the DTC were detected by Polymerase Chain Reaction (PCR). Four normal, 4 severe abnormal hyperplasia and 4 squamous cell carcinoma tongue were taken as control. **Results** Thirty five CK+ cells from the 35 smear respectively were successfully isolated by LCM. Genomic DNA were successfully amplified by single-cell WGA in 3 out of 35 cells. Homozygous deletions of RB1CC1 gene were found in 2 of the 3 CK+ cells and 2 in 4 cases of squamous cell carcinoma tongue mucosa. However, the deletion was not found in the rest tissues. **Conclusion** Homozygous deletion of RB1CC1 gene of the CK+ positive cells in the severe abnormal hyperplasia stage may be the disseminated tumor cells.

[Key words] Mouse; Disseminated tumor cells; LCM; RB1CC1 gene; Homozygous deletion

* 本研究论文于口腔颌面修复与重建研究实验室(广西壮族自治区重点实验室)、颌面外科疾病诊治研究实验室(广西高校重点实验室)中完成

视网膜母细胞瘤诱导卷曲蛋白 (Retinoblastoma 1 RB1-inducible coiled-coil 1, RB1CC1) 是视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 抑癌基因的激活剂, 在癌变发生过程中, Rb 抑癌基因的失活是一个非常早期的基因事件^[1]。但有研究发现 RB1CC1 基因的杂合性缺失不会导致肿瘤的发生。原因是野生型 RB1CC1 基因的一个等位基因足以维持潜在的抑癌功能^[2]。本课题组前期采用的化学药物 4NQO 饮水法成功诱发小鼠口腔癌淋巴结转移模型^[3], 其癌变过程与人类口腔癌相似^[4], 并发现小鼠模型癌变及淋巴结转移时期骨髓单个核细胞涂片有细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 阳性细胞, 舌重度异常增生时期也已出现 CK 阳性 (CK+) 细胞^[5]。因正常骨髓无上皮细胞, CK 是上皮细胞的特异性标志, 说明这些舌重度异常增生时期的 CK+ 细胞可能是异常的播散细胞。但这些细胞是来源于原发灶的异常播散肿瘤细胞 (disseminated tumor cells, DTC) 还是假阳性染色仍需鉴别。因此, 本实验通过提取小鼠模型舌重度异常增生时期骨髓的单个 CK+ 细胞 DNA, 初步检测其 RB1CC1 基因纯合性缺失的情况, 进一步验证课题组前期实验获得的 CK+ 细胞是 DTC 的可信度。

1 材料与方法

1.1 标本组织 收集 35 只小鼠口腔癌淋巴结转移模型舌部病理明确诊断为重度异常增生且显微切割载玻片骨髓涂片发现 CK+ 细胞的骨髓单个核细胞涂片, 提取骨髓单个核细胞、制片方法及免疫组化参照参考文献^[3,5]方法。并收集舌部正常、重度异常增生及鳞癌组织各 4 例, 提取 DNA 作对照。

1.2 显微切割 应用激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 系统 (ZEISS PALM 型) 捕获 LCM 专用载玻片上的单个 CK+ 细胞, 并在无菌的收集盖上确定成功捕获目标细胞, 将收集盖盖回 0.6 ml 的离心管, 离心备用。

1.3 主要试剂 ZEISS LCM 专用 PEN 膜载玻片、Sigma 单细胞全基因组扩增试剂盒 WGA4、Qiagen QIAquick PCR Purification Kit、Qiagen QIAamp DNA Mini Kit、DDH₂O、DL500 DNA Marker、Premix Tap (Takara)、Goldview I 型核酸染色剂、5×TBE 液 (上海生工生物工程有限公司)、琼脂糖 (北京华美生物工程公司)。

1.4 引物设计 引物序列均来自 Genbank, 由大连 Takara 生物公司设计, 包括内参 GAPDH 和 RB1CC1 第二外显子上的一个序列片段, 其具体信息见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

引物	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
GAPDH	F: AGCGAGACCCCACTAACATC	419	57.3
	R: TCCCCACTGCCTACATACCA		
RB1CC1	F: CATTTCCTTTTACCCCCAC	315	53.1
	R: GGAATCTCTTACTTCACTCT-GACG		

1.5 DNA 提取及纯化 单细胞全基因组扩增 (whole genome amplification, WGA) 技术提取及扩增单个 CK+ 细胞的 DNA, 具体步骤按 WGA4 试剂盒说明书, 并用 Qiagen DNA Purification Kit 试剂盒纯化 DNA 产物。小鼠舌部组织的 DNA 用 Qiagen QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取。OD 值在 1.7~1.9 的 DNA 可用于 PCR。

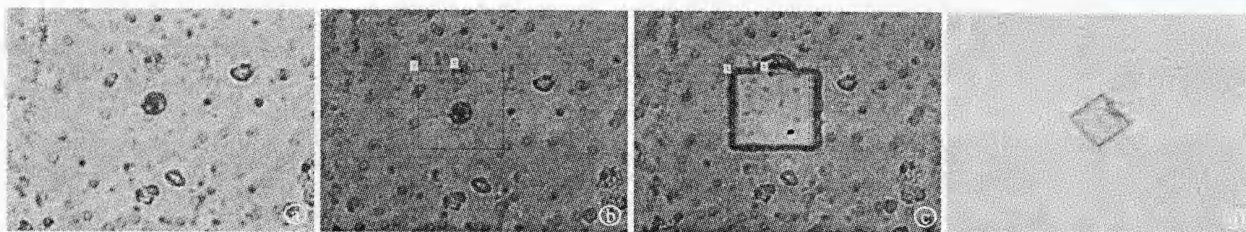
1.6 PCR 扩增 (1) 单细胞 WGA 产物的反应体系: 模板 DNA (约 30 ng/μl) 4 μl, 上、下引物各 (10 pmol/μl) 1 μl, Premix Tap 10 μl, DDH₂O 9 μl。(2) 舌部组织的反应体系: 模板 DNA (约 100 ng/μl) 1 μl, 上、下引物各 (10 pmol/μl) 1 μl, Premix Tap 10 μl, DDH₂O 12 μl。(3) 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 退火温度见表 1, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。

1.7 PCR 产物分析 取不同的 PCR 扩增产物 5 μl, 用 2% 的琼脂糖凝胶 50 ml (加 5 μl Goldview I 型核酸染料) 电泳, 凝胶成像分析系统观察并采图。

1.8 结果判定 (1) 单细胞全基因组扩增成功的判断标准: OD 值在 1.7~1.9 的 DNA, 且内参可成功扩增出 GAPDH 相应的条带。(2) 纯合性缺失的判断标准: 如果存在纯合性缺失, 则应没有相应的电泳条带出现。对于发生纯合性缺失的标本, 重复 PCR 扩增 2 次, 以排除假阳性结果。并与舌正常组织、重度异常组织、癌组织以及水的 PCR 产物对照。

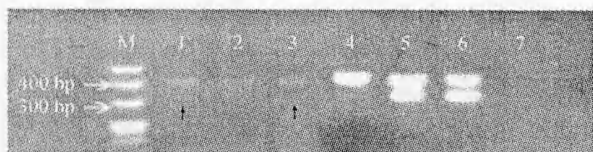
2 结果

LCM 切割 46 个 DTC, 成功从 35 张小鼠骨髓涂片各捕获 1 个 DTC (共 35 个, 捕获过程见图 1), 成功率为 76%。扩增 CK+ 细胞 35 个, WGA4 扩增成功且 PCR 成功扩增出内参 GAPDH 的单细胞为 3 个, 成功率为 8.6%。RB1CC1 基因纯合性缺失情况为单个 CK+ 细胞 (2/3), 舌鳞癌组织 (2/4), 舌部正常组织 (0/4), 重度异常增生组织 (0/4)。PCR 产物电泳结果见图 2。免疫组化防脱载玻片骨髓单个核细胞涂片染色结果见图 3。



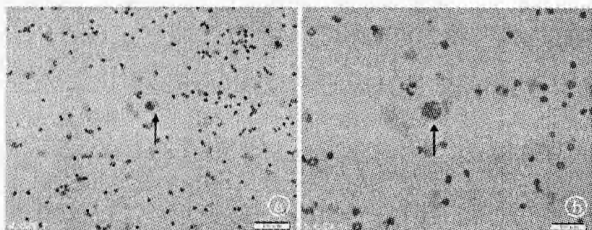
①:锁定 PEN 膜上的 CK + 细胞; ②:LCM 激光切割及弹射定位; ③:成功捕获后的 PEN 膜有圆半形缺失,对周围无影响; ④:收集盖上被成功捕获的 CK + 细胞

图 1 LCM 技术捕获 CK + 细胞的过程



M:DNA Marker; 1~3:CK + 细胞(RB1CC1 纯合性缺失见黑色箭头); 4:舌鳞癌组织; 5:舌重度异常增生; 6:舌正常组织; 7:水(阴性对照)

图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果



①:舌重度异常增生小鼠骨髓细胞涂片 Pan-ck 阳性表达,阳性细胞见黑色箭头所指(S-P 染色法, $\times 200$); ②:图① $400\times$ 镜下

图 3 小鼠模型重度异常增生时期骨髓涂片 Pan-CK 免疫组化检测的结果

3 讨论

3.1 RB1CC1 又称 FIP200(focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa),其蛋白位于染色体 8q11 区,含核信号表达区、亮氨酸拉链区、卷曲螺旋结构。人和鼠的 FIP200 基因都含有 24 个外显子,基因组结构相似,蛋白一致性达 90%^[6]。研究认为 RB1CC1 基因是具有抑癌功能的基因^[1,7,8]。在肿瘤转移过程中,黏着斑激酶的激活提示肿瘤的转移,RB1CC1 基因可通过抑制黏着斑激酶的活性从而抑制细胞的播散和迁移^[9]。本研究发现,4 例舌部正常组织和 4 例重度异常增生组织均无 RB1CC1 基因纯合性缺失,舌鳞癌组织 RB1CC1 基因有纯合性缺失。这一结果支持 RB1CC1 基因是抑癌基因,可能参与口腔癌的发生。还有重度异常增生时期骨髓 CK + 细胞也出现 RB1CC1 基因纯合性缺失,而其原发灶重度异常增生时期舌部组织无纯合性缺失,

说明 RB1CC1 基因缺失突变可能是导致 CK + 细胞的播散原因之一,提示 RB1CC1 基因纯合性缺失突变可能参与 DTC 的早期播散,为本课题组前期实验发现的 CK + 细胞可能是 DTC 提供了基因方面的支持。

3.2 本研究还发现,单细胞扩增产物 DNA 浓度较低,约 30 ng/ μ l,即使增加体积提高体系中的 DNA 含量,理论上与浓度约 100 ng/ μ l 舌部组织 1 μ l DNA 的含量相近,但相同的 5 μ l PCR 的产物在琼脂糖电泳结果中,单细胞全基因组扩增产物的条带亮度明显低于舌部组织的条带。主要原因可能是单细胞全基因组扩增产物 DNA 质量不高,实际浓度较低。

综上所述,在小鼠口腔癌模型舌重度异常增生时期的骨髓播散细胞中,RB1CC1 基因的纯合性缺失突变可能是其基因失活和肿瘤细胞播散的重要机制之一。对癌变早期骨髓播散细胞 RB1CC1 基因的深入研究有助于揭示口腔癌的发病及播散机制,为说明肿瘤细胞在肿瘤极早期甚至癌前病变阶段就已播散提供理论依据。

参考文献

- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003,100(13): 7737 - 7742.
- Gan B, Peng X, Nagy T, et al. Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNF α and TSC-mTOR signaling pathways[J]. J Cell Biol, 2006,175(1):121 - 133.
- Li J, Liang F, Yu D, et al. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2013,49(4):299 - 305.
- 黎明武,李 晶,于大海,等. 4-NQO 饮水法不同给药时间诱发小鼠舌癌模型比较[J]. 中国临床新医学,2012,5(7):581 - 584.
- 施 强,黎明武,于大海,等. 小鼠口腔癌淋巴道转移模型骨髓播散肿瘤细胞的检测[J]. 临床口腔医学杂志,2014,30(4):208 - 210.
- Chano T, Ikegawa S, Saito-Ohara F, et al. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human RB1CC1 genes[J]. Gene,

- 2002(1-2), 291:29-34.
- 7 Chano T, Kontani K, Teramoto K, et al. Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer[J]. Nat Genet, 2002, 31(3):285-288.
- 8 Chano T, Ikegawa S, Kontani K, et al. Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells[J]. Oncogene, 2002, 21(8):1295-1298.
- 9 Gan B, Guan JL. FIP200, a key signaling node to coordinately regulate various cellular processes[J]. Cell Signal, 2008, 20(5):787-794.
- [收稿日期 2015-01-15][本文编辑 杨光和]

课题研究·论著

前列腺病变的直肠超声声像图特点及前列腺癌分期观察指标的相关性分析

贺 琰, 王小燕, 凌 冰, 黄向红, 农美芬, 廖明珠, 董小圆, 韦海明

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018295)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院超声科(贺 琰, 王小燕, 凌 冰, 黄向红, 农美芬, 廖明珠, 董小圆), 病理科(韦海明)

作者简介: 贺 琰(1984-), 女, 在读研究生, 主治医师, 研究方向: 小器官及介入性超声。E-mail: julysnow163@qq.com

通讯作者: 王小燕(1957-), 女, 大学本科, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 小器官及介入性超声。E-mail: ultrasoundwang@sina.com

[摘要] 目的 系统地观察及探讨经直肠超声(TRUS)及超声引导下穿刺对前列腺肿大病变患者超声图像特征及前列腺癌(PCA)的前列腺特异性抗原(PSA)及临床分期超声表现特征。方法 应用经直肠彩色多普勒超声对临床拟诊为 PCA 患者进行检查, 然后经直肠超声引导下前列腺穿刺, 方法为系统 6 点加可疑结节处穿刺法; 与血清 PSA 及病理结果对照; 并将前列腺癌血清 PSA、穿刺活检阳性百分数(PPBCs)、Gleason 评分与临床分期进行对照比较。结果 经病理证实 413 例中 PCA 149 例, 前列腺增生 171 例, 增生并炎症 44 例, 增生并上皮内瘤(PIN)、非典型增生(AAH)共 49 例。前列腺癌与临床(Whitmore-Jewett 法)A、B、C、D 分期对照有一定的临床分期的超声声像图特征性表现, 不同 PCA 临床分期的 TRUS 声像图特点: 血清 PSA、PPBCs 及 Gleason 评分三者分别与 PCA 临床分期呈显著正相关。结论 经直肠彩色多普勒超声能清晰显示前列腺内部结构, 前列腺病变尤其是前列腺癌超声声像图有一定的特征性表现, 结合 PSA 有助于提高前列腺病变诊断水平。

[关键词] 经直肠超声; 前列腺病变; 病理学; PSA**[中图分类号]** R 445; R 737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)05-0397-07

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.05.04

Relationship of image features of transrectal ultrasound of prostate disease and the observation outcome in clinical stages of prostate cancer HE Yan, WANG Xiao-yan, LING Bing, et al. Department of Ultrasonography, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To observe and explore the characteristics of ultrasonography for transrectal color Doppler ultrasound in the diagnosis of hypertrophy of the prostate disease and specific antigen(PSA) and image features in clinical stages of prostate cancer(PCA) systematically. **Methods** Patients clinically suspected of PCA underwent prostate exam by transrectal color doppler ultrasound, then by transrectal ultrasound guided prostate biopsy by 6 points adding suspected nodes method, comparing with the PSA, pathologic results, PPBCs, Gleason score, and clinical stages. **Results** In 413 patients confirmed by pathology(149 PCA, 171 BPH, 44 BPH with inflammation, 49 BPH with PIN and AAH), prostate disease had some characteristic ultrasound images. Clinical stages A, B, C or D (Whitmore-Jewett methods) of PCA had some different characteristics of ultrasound images. The results showed that PSA, PPBCs and Gleason grades were positively correlated with PCA stages respectively. **Conclusion** Transrectal