

巢式 RT-PCR 扩增 Keratin 19 诊断 胃癌淋巴结微转移方法及应用

陈瑞川¹, 苏金华¹, 蔡克瑕¹, 陈路芸², 李力², 吴艳环³ (1. 厦门大学生命科学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学院生物系, 福建 厦门 361005; 3. 厦门市中山医院, 福建 厦门 361005)

Method of Detecting Gastric Cancer Micrometastases in Lymph Nodes by Nest RT-PCR Amplification of Keratin 19 and its Application

CHEN Rui chuan, SU Jinhua, CAI Kexia, et al.

(Dept. of Biology, Life Science College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Purpose] To develop a RFLPCR method to amplify Keratin 19 mRNA for detecting gastric cancer cells metastases in gastric lymph nodes and to evaluate its specificity and sensitivity. [Methods] The RFLPCR system was set up by using nest primer. Its amplification products was identified by restriction enzyme digestion and DNA dot blot. The sensitivity was estimated with serial diluted reverse transcript templates. Moreover, 51 lymph nodes were analyzed by this RFLPCR method and pathological examination, respectively. [Results] This system possessed a good specificity, its detection sensitivity was 1pg RNA from 100ng control RNA which means detecting out one gastric cancer cell from 10⁵ lymph cells. The results performed on clinical gastric lymph nodes showed that the sensitivity of RFLPCR was superior to pathological examination. The dot hybridization test further proved the high specificity of RFLPCR. [Conclusion] The amplification system presents good reliability, high sensitivity and specificity.

Key words: stomach neoplasms; polymerase chain reaction; Keratin 19; lymphatic metastasis; gene amplification

摘要: [目的] 建立 RFLPCR 扩增 Keratin 19 mRNA 的方法, 评价其应用前景。[方法] 采用 Keratin 19 cDNA 的套式引物建立巢式 RFLPCR 扩增体系, 以酶切分析及 DNA 点杂交法鉴定扩增产物的特异性, 逆转录产物系列稀释法分析检测敏感性, 并对 51 例临床胃周淋巴结样品作初步检测。[结果] 该扩增体系具有较好的扩增特异性, 检测敏感性达 1pg RNA, 相当于从 10⁵ 个淋巴细胞中检出 1 个胃癌细胞; 对临床样品检测结果显示该法较病理检查法敏感性高。[结论] 该扩增体系具有较好的特异性、敏感性和较高的可靠性。

关键词: 胃肿瘤; 聚合酶链反应; 角蛋白 19; 淋巴结转移; 基因扩增;

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-5504(2000)04-0216-03

应用 RFLPCR 检测癌细胞淋巴结微转移具有敏感、特异的优点, 其原理是选择肿瘤组织特异表达而被转移组织不表达的基因, 利用 RFLPCR 扩增检测该基因的转录产物, 即可判断是否存在转移的癌细胞^[1,2]。Keratin19 是角蛋白基因之一, 在淋巴结和外周血细胞中不表达^[2]; 有报道证实该基因在胃癌中表达率达 100%^[3]。故本文采用套式引物建立巢式 RFLPCR 扩增 Keratin 19 mRNA 的体系及方法, 并对临床样品进行了初步检测。

1 材料与方 法

1.1 试剂及样品

试剂: AMV 逆转录酶、Taq 酶、DNase I、内切酶等为 Promega 产品; pBR322/Hae III Marker、RNasin 及

有关的生化试剂等为华美生物工程公司上海分公司生产; 其余均为国产分析纯。

细胞株: 人胃腺癌 MGC803 及人早幼白血病 HL-60 细胞株为本单位细胞生物研究室保存; 常规方法培养。

组织样品收集: 胃周淋巴结样品分别取自胃癌患者手术切除标本 (40 例) 和非癌患者胃手术切除标本 (11 例); 胃及胃癌活检样品取自行胃镜检查患者; 样品均作常规病理切片检查^[4], 其中淋巴结样品镜检证实转移阳性者 32 例, 阴性者 19 例。外周血取自健康人, 常规方法分离白细胞。

引物设计及合成: β -actin 引物按报道^[3], Keratin 19 的套式引物根据其 cDNA 序列并参照文献报道^[2]以 DNASIS 软件系统设计, 序列如下:

AF: 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'

AR: 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGF-3'

KF1: 5'-AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3'

KR1: 5'-GAGGACCTTGGAGCCAGACA-3'

KF2: 5'-CTGCCTTGAAGACACTG-3'

收稿日期: 2000-01-31; 修回日期: 2000-07-10
本文由福建省卫生厅基金 (编号: 96075) 和福建省自然科学基金 (F00024) 资助

KR2: 5'-ATCTTCCTGTCCTCGAGCAG-3'

AF加AR的扩增产物长为154bp。KF1加KR1的扩增产物为494bp的片段,以此扩增产物为模板再用KF2加KR2扩增的产物长为215bp。引物均由上海生工公司合成。

1.2 总RNA提取

按Chomczynski一步法^[5]提取总RNA并以甲醛凝胶电泳鉴定完整性。

1.3 逆转录

参照文献方法^[6]并作修改如下:在20 μ l的逆转录体系中,含经热变性处理的RNA 2 μ g, 1mmol/L dNTPs, 20 U RNasin, 10U AMV 逆转录酶及100pmol六核苷酸随机引物, 37 $^{\circ}$ C逆转录60min, 95 $^{\circ}$ C灭活10min。

1.4 PCR及巢式PCR扩增

β -actin扩增及Keratin19的第一轮扩增: 50 μ l的体系含缓冲液、1 μ l~5 μ l逆转录产物、2.0mmol/L MgCl₂、100 μ mol/L dNTPs、25pmol的上下游引物(AF+AR或KF1+KR1) 2.5U Taq 酶, 95 $^{\circ}$ C变性5min后进入PCR循环,循环参数为94 $^{\circ}$ C 1min、60 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min, 40个循环,72 $^{\circ}$ C补齐5min。Keratin 19的第二轮扩增体系为: 50 μ l 体积含5 μ l 第一轮扩增产物、1000 μ mol/L dNTPs、25pmol 上下游引物(KF2+KR2),其余成份及循环参数均同上。扩增产物以2%琼脂糖电泳、EB染色、紫外观察及拍照。

1.5 PCR产物的酶切鉴定

根据扩增产物的序列,选择Hinf I 酶切消化 β -actin的扩增产物;Xho I 及Hinf I 分别酶切Keratin 19的扩增产物,酶切后以12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳、EB染色、紫外观察及拍照分析。

1.6 PCR产物的点杂交验证

取RT-PCR的扩增产物5 μ l 碱变性后于12 \times 8孔的点膜器上点于硝酸纤维素膜,80 $^{\circ}$ C烤2h。另取上述经酶切鉴定并经低熔点琼脂糖电泳纯化的PCR产物为模板,参照DIG DNA 标记检测试剂盒说明及前文报道^[7]进行探针标记及杂交检测。

2 结果

2.1 RT-PCR的扩增特异性

由DNASIS 软件系统分析表明:Keratin 19的PCR产物经Hinf I 或Xho I 酶切后可分别产生125bp及90bp或198bp及17bp的片段;而 β -actin的

PCR扩增产物经Hinf I 酶切后可产生86bp及68bp的片段。图1所示为Keratin 19及 β -actin的PCR扩增产物经Hinf I 或Xho I 酶切后的PAGE-EB分析结果。显示酶切后产生的片段大小与序列分析结果一致,表明所建立的RT-PCR体系具有较好的扩增特异性。

2.2 RT-PCR的检测敏感性

将来自MGC803的逆转录产物(cDNA)按10倍稀释后各取1 μ l(相当于100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1pg及100fg的RNA),再各加入来自HL-60逆转录产物1 μ l(相当于100ng的RNA)混合为模板,分别以Keratin 19的套式引物及 β -actin的引物进行PCR扩增,扩增后将Keratin19及 β -actin管中的PCR产物混匀上样,电泳分析,结果见图2。显示检测敏感性达1pg的RNA,该敏感性相当于从10⁵个白细胞或淋巴细胞中检测出1个胃癌细胞。

2.3 临床样品的RT-PCR分析结果

以RT-PCR对经病理检查过的51例胃周淋巴结样品进行检测:32例病理检查转移阳性及11例非胃癌患者(转移阴性)样品的RT-PCR检测结果显示与病理检查结果一致,但在另8例病理检查阴性的来自胃癌患者的胃周淋巴结样品中,RT-PCR检测阳

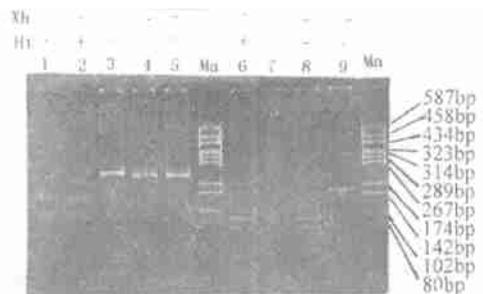


图1 Keratin 19及 β -actin RT-PCR扩增产物的酶切分析结果

Ma: pGEM3Zf(+)/Hae III; 1, 4: MGC803; 2, 5: 胃粘膜活检标本; 6: 外周血白细胞; 7: 正常淋巴结; 8: HL60; 3: Keratin 19; 9: β -actin

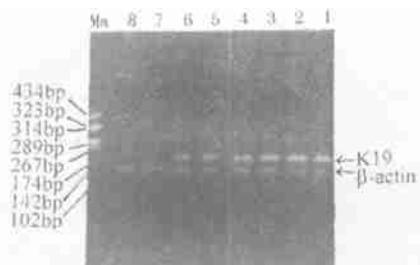


图2 RT-PCR的检测敏感性分析

Ma: pGEM3Zf(+)/Hae III; MGC803 RNA量为1: 100ng、2: 10ng、3: 1ng、4: 100pg、5: 10pg、6: 1pg、7: 100fg

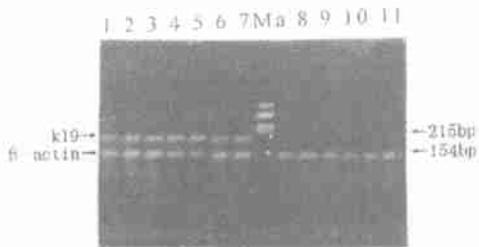


图3 部分胃淋巴结样品 RT-PCR 检测结果

Ma: pCEM3Z(+)/Hae III marker;

1, 2: 病理检查阳性胃癌胃周淋巴结样品

3~ 7: 病理检查阴性胃癌胃周淋巴结样品

8~ 10: 病理检查阴性胃癌胃周淋巴结样品

10, 11: 非胃癌胃周淋巴结样品

表1 胃周淋巴结样品 RT-PCR 检测与病理检查结果比较

RT-PCR 检测结果 (例)	病理检查结果(例)	
	阳性	阴性
阳性	32	5
阴性	0	14

性者 5 例(见图 3), 表明 RT-PCR 检测敏感性较病理检查法高(见表 1)。

2.4 PCR 产物的点杂交验证

以上述 RT-PCR 产物点膜, 分别以 β -actin 及 Keratin 19 的 DIG 标记探针进行杂交检测, 结果显示: 以 β -actin 探针杂交检测所有产物均阳性, 而 Keratin 19 探针检测显示 RT-PCR 检测阳性的胃癌胃周淋巴结样品 (37 例) 均有杂交信号, 检测阴性的 (14 例) 则杂交阴性, 表明 Keratin 19 作为 RT-PCR 检测胃癌淋巴结微转移标志基因有较好的可靠性。

3 讨论

目前胃癌淋巴结转移的临床检测主要靠病理检查, 敏感性较差, 一些微小转移灶常被漏检, RT-PCR 技术因其具有较高的敏感性和特异性而被应用于癌微转移的检测^[1]。RT-PCR 技术的应用依赖于特异标志基因; Keratin 19 在胃癌的表达率为 100%^[3], 因此该基因也可作为检测胃癌淋巴结转移的标志基因。本文以套式引物建立了巢式 RT-PCR 扩增检测 Keratin 19 mRNA 的方法, 其敏感性达 1pg RNA, 即可从 10⁵ 个淋巴或白细胞中检出 1 个胃癌细胞, 较 Mori^[8] 及 Noguchi^[2] 报道的敏感性高, 也较病理探查结果更敏感(见图 3 及表 1)。为减化 PCR 过程, 我们曾按 Noguchi 报道的引物对 (KF1+ KR2) 以常规 PCR 方法进行扩增, 但未能获得较好的特异性, 可能与所用的

PCR 试剂成份不同有关。巢式 RT-PCR 虽然增加了一步 PCR, 但对于提高扩增的特异性及敏感性均有助益。

RT-PCR 检测的敏感性已被公认, 但也常出现非特异扩增^[9]; 由于目前尚无较 RT-PCR 更敏感的方法来对 RT-PCR 临床检测结果的特异性进行验证^[10], 本文尝试以酶切分析法及 DNA 点杂交法对扩增产物进行分析, 其根据在于若能证实扩增产物的特异性即可确定 RT-PCR 检测结果的可靠性^[9]; 同时对临床样品也作了选择, 特选了取自非胃癌患者手术标本 (不存在胃癌转移) 淋巴结来进行 RT-PCR 检测, 较全面地考察了本法的特异性, 显示 Keratin19 作为 RT-PCR 法检测胃癌淋巴结转移的标志基因具有较高的可靠性及应用价值。对临床样品的检测结果也说明了该 RT-PCR 扩增体系具有较好的可靠性。当然, 该扩增体系还需更多的临床验证。

参考文献:

- [1] 江继发, 魏海明. 检测肿瘤转移指标的临床意义 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25: 224- 226.
- [2] Noguchi S, Hiratsuka M, Funakawa H, et al. Detection of gastric cancer micrometastases in axillary lymph nodes by amplification of Keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87: 650- 654.
- [3] Moll R, Franke WW, Colombero A. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells [J]. Cell, 1982, 31: 11- 24.
- [4] Chen RC, Zhang CG, Wu YH, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection I: a qualitative method and its application [J]. World Chinese J Digestion, 1998, 6: 192- 194.
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156- 159.
- [6] 荆永娜, 卢大儒, 邱信芳, 等. 影响反转录过程多种因素的探讨 [J]. 细胞生物学杂志, 1998, 20: 38- 41.
- [7] 陈瑞川, 杨善民, 张铮, 等. 视黄酸对 BEL-7402 细胞酶活性及基因表达的影响 [J]. 厦门大学学报, 1998, 37: 259- 264.
- [8] Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. Cancer Res, 1995, 55: 3417- 3420.
- [9] 林万明. PCR 技术操作和应用指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1993, 30- 50.
- [10] 张琴. 肿瘤微转移检测的进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1996, 23: 224- 226.