

• 临床研究 •

银染 RT-PCR 检测胃癌淋巴结微转移方法的探讨

陈瑞川¹, 林 岚², 苏金华¹, 乔玉欢², 吴艳环³

中图分类号: R73-37; R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7431(2000)03-0206-03

摘要:目的 建立 RT-PCR 检测胃周淋巴结胃癌转移细胞的方法, 评价其临床应用价值。方法 以 MUC1 cDNA 的引物建立了 RT-PCR 扩增体系及 PAGE-银染检测 PCR 扩增产物的方法, 并作了优化; 在对扩增体系的检测特异性和敏感性作了分析后, 初步检测了临床样品。结果 该扩增体系具有较好的特异性, 敏感性可达 10^{-6} μg RNA, 相当于从 10^5 个淋巴细胞中检出 1 个胃癌细胞; 对临床样品检测的结果与病理检查结果相符。结论 该法具有较好的可靠性, 可作为临床常规病理探查的补充检查手段。

关键词: 胃肿瘤; 肿瘤转移; 淋巴结; RT-PCR; 基因, MUC1

DETECTING GASTRIC CANCER MICROMETASTASES IN AXILLARY LYMPH NODES BY RT-PCR AMPLIFICATION AND SILVER STAINING CHEN Rui-chuan¹, LIN Lan², SU Jinhua¹, et al.¹ Cancer Res. Center, ² Dept. of Biology, Xiamen Univ. Xiamen 361005, China

Abstract Objective To develop a RT-PCR method for detecting gastric cancer micrometastases in axillary lymph nodes. **Methods** The RT-PCR was set up for amplifying MUC1 mRNA and the PAGE-silver staining for detecting amplification products. After optimizing the PCR system, the specificity and sensitivity were investigated by amplifying different selected samples and serial dilution method respectively. This method was performed on axillary lymph nodes and compared the results with that of pathological examination for estimating the reliability. **Results** This system showed a good specificity and a high sensitivity of detecting one gastric cancer cell out of 10^5 lymphocytes. The results corresponded with the pathological examination suggesting a good reliability of this method. **Conclusion** The RT-PCR method possesses a high reliability and promise in clinical application.

Key words: Gastric neoplasms; Lymph node; RT-PCR; Gene, MUC1; Neoplasm metastasis

基金项目: 福建省卫生厅基金(96075)和厦门大学肿瘤细胞工程开放实验室基金资助项目

作者单位: 1. 厦门大学生命科学院抗癌中心(厦门 361005)

2. 厦门大学生命科学院生物系

3. 厦门市中山医院

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, 其原理是选择肿瘤细胞特异标志基因或肿瘤组织特异表达而被转移组织不表达的基因, 利用 RT-PCR 方法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]。MUC1 是多形上皮细胞粘蛋白基因, 在上皮细胞及其衍生的癌细胞中有表达, 而淋巴及白细胞不表达^[3]。近已有 RT-PCR 扩增 MUC1 mRNA 检测乳腺癌的报道^[4]。本文建立了 RT-PCR 扩增 MUC1 mRNA 的体系及方法, 并以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)-银染检测扩增产物, 用于检测胃癌细胞淋巴结微转移。

材料与amp;方法

一、试剂及样品

试剂 AMV 逆转录酶、Taq 酶、DNase iv、内切酶等为 Promega 产品; pBR322/Hae Ⅳ Marker、RNase 和 RNA 提取、电泳分析、逆转录及 PCR 等相关生化试剂购自华美上海分公司; 其余均为国产分析纯试剂。

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(12 例)和非癌患者胃手术切除标本(9 例); 正常胃及胃癌组织活检样品(各 10 例)取自胃镜检查患者; 样品均作病理常规检查。外周血取自健康人(8 例), 常规方法分离白细胞。

引物合成 MUC1 及 β -actin 的引物序列均按文献报道^[4]: MF: 5'-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCAA-3' 及 MR: 5'-CGTCGTGGACATGATGGTACG-3'; AF: 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3', AR: 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'。以 cDNA 为模板, 前者的扩增产物长 288bp, 后者为

154bp; 以基因组 DNA 为模板的扩增产物, 前者长 536bp, 后者为 254bp。引物均由上海生工公司合成。

二、RNA 提取及电泳

按 Chomczynski 的一步法^[5] 提取总 RNA 并以甲醛凝胶电泳鉴定其完整性。

三、逆转录

参照文献^[6] 并略作修改如下: 在 20 μl 的逆转录体积中, 含经热变性处理的 RNA 2 μg、1 mmol/L dNTPs、20 U RNasin、10 U AMV 逆转录酶及 100 pmol 六核苷酸随机引物, 37 °C 逆转录 60 min, 95 °C 灭活 10 min。

四、PCR 扩增

PCR 扩增体系和方法参照文献^[4] 并修改如下: 20 μl 的体积中含 1 μl 逆转录产物、2.0 mmol/L MgCl₂、100 umol/L dNTPs、12.5 pmol 的上下游引物(AF+ AR 或 MF+ MR) 及 1U Taq 酶, 95 °C 变性 5 min 后进入 PCR 循环, 循环参数为 94 °C 1 min、60 °C 1 min、72 °C 1 min, 40 个循环, 72 °C 补齐 5 min; 扩增产物以 PAGE- 银染分析。

5. PAGE- 银染分析

聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%, 胶厚为 0.6 mm, 上样量为 2~ 5 μl, 150V~200V 电泳 1 h 后按报道的方法^[7] 进行银染分析。

结 果

一、RT-PCR 扩增条件优化

选定 2.0 mmol/L MgCl₂ 浓度下, 以不同的退火温度进行 PCR 扩增, PAGE 银染分析结果; 退火温度在 60 °C 以上时, 扩增效果较好, 其余均不能产生理想结果。选定 60 °C 退火温度, 于 PCR 体系中加入不同浓度的 MgCl₂, 扩增后 PAGE 银染分析的结果; 最佳 MgCl₂ 浓度在 1.5 mmol/L~2.0 mmol/L 范围内, 此范围之外亦不能产生较好的结果。

二、RT-PCR 的扩增特异性

以 MUC1 及 β-actin 的引物分别对人胃癌细胞 MGC-803、正常胃及胃癌活检组织、人早幼白血病细胞 HL-60、正常淋巴结及外周血细胞总 RNA 的逆转录产物进行 PCR 扩增后 PAGE- 银染分析。可见胃及胃癌活检组织和胃癌细胞均有 MUC1 及 β-actin 的扩增产物, 而 HL-60、正常淋巴结及外周血细胞仅有 β-actin 的扩增产物, 表明该扩增体系有较好的特异性(见图 1)。

三、RT-PCR 的检测敏感性

将 MGC803 总 RNA 的逆转录产物(cDNA) 按 10 倍稀释后各取 1 μl(相当于 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ μg RNA), 再各加入 HL-60 总 RNA 的逆转录产物 1 μl(相当于 0.1 μg RNA) 混合为模板, 分别以 MUC1 的引物及 β-actin 的引物进行 PCR 扩增, 扩增后分别从 MUC1 及 β-actin 扩增管中取 2 μl PCR 产物混匀, PAGE- 银染分析, 显示检测敏感性为 10⁻⁶ μg 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。

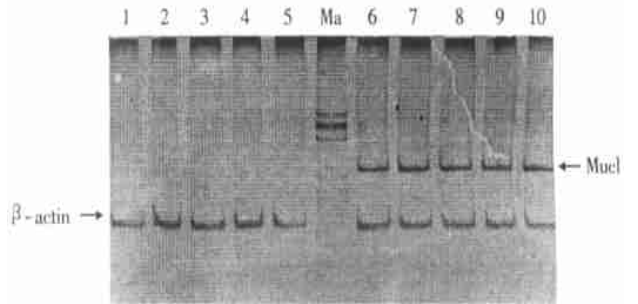


图 1 RT-PCR 的扩增特异性 Ma: pBR322/Hae III marker; L: HL-60; 2-3: 正常淋巴结; 4, 5: 外周血细胞 6. MGC803; 7, 8: 胃癌组织; 9, 10: 胃正常组织;

四、临床样品的 RT-PCR 分析结果

以 MUC1 引物及 β-actin 引物分别对经过病理切片检查诊断的、来自胃癌(转移阳性, 12 例) 及非胃癌患者(转移阴性, 9 例) 的胃周淋巴结样品进行 RT-PCR 检测, 结果与病理检查一致。图 2 所示为部分胃周淋巴结样品的 RT-PCR 检测结果。



图 2 部分胃周淋巴结样品 RT-PCR 检测的结果 Ma: pBR322/Hae III marker L: 7: 取自非胃癌患者的胃周淋巴结样品 8-19: 取自胃癌患者的胃周淋巴结样品

讨 论

目前, 文献报道中选用于 RT-PCR 检测癌微转移的标志基因多数为组织特异性基因, 即在癌组织及癌起源的正常组织均有该标志基因表达产物(mRNA), 但在待检测的怀疑被转移的组织(如淋巴结、外周血) 中则没有该基因的表达产物; 由于只有

癌细胞才具有转移性,故若在被检测的淋巴组织或外周血中检测出该标志基因的表达产物,即可判断该表达产物来自转移的癌细胞。因此,运用 RT-PCR 方法检测癌转移的关键是选择合适的标志基因。

MUC1 是多型上皮细胞粘蛋白基因之一,已被证实多种正常上皮细胞及其衍生的肿瘤细胞中有表达,而在淋巴及白细胞中不表达^[3]。其敏感性为从 10^6 个淋巴细胞中检测出 1 个乳腺癌细胞。但 MUC1 基因在正常胃及胃癌组织中的表达状况尚不清楚,本文建立了 RT-PCR 扩增 MUC1 mRNA 的体系,以 RT-PCR 方法首次证实 MUC1 在正常胃及胃癌组织中均存在表达。并采用 PAGE 分析、银染检测扩增产物的方法以提高产物分析判断的准确性。

PCR 扩增产物的产量及特异性受退火温度及 Mg^{2+} 浓度的制约。对该体系扩增条件优化分析表明(见图 1, 2),该体系对退火温度要求较高,与 Noguchi 的报道结果^[4]一致。RT-PCR 的检测敏感性除与扩增体系及条件有关外,也与被检标志基因在细胞中的表达量有关。Mori 等报道^[8]以 RT-PCR 扩增 CEA mRNA 检测胃癌淋巴结转移,敏感性为 10^4 个淋巴细胞中检测出 1 个胃癌细胞。本文的检测敏感性为 $10^{-6} \mu\text{g RNA}$,该敏感性相当于从 10^5 个淋巴细胞中检测出 1 个胃癌细胞,比 Noguchi 报道的敏感性^[4]低,这可能与电泳上样量不同有关,Noguchi 报道的上样量是 35 μg 样品,而作者的上样量为 2 μg 样品,此外 MUC1 在胃癌及乳腺癌细胞中

表达量是否有差别尚待探讨。由于本文以建立方法为主,所选胃周淋巴结为病理检查转移阳性或取自非胃癌患者手术标本(不存在胃癌转移)的淋巴结,检测结果初步表明该体系具有一定的可靠性,但还需更多的临床考察,以确定该 RT-PCR 方法的实用性。

参考文献

- [1] 张琴. 肿瘤微转移检测的进展[J]. 国外医学肿瘤分册, 1996, 23: 224
- [2] Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction[J]. Cancer Res, 1994, 34: 2986
- [3] Kitamura H, Yonezawa S, Tanaka S, et al. Expression of mucin carbohydrates and core proteins in carcinomas of the ampulla of Vater: their relationship to prognosis[J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87: 631
- [4] Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, et al. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Cancer, 1994, 74: 1595
- [5] Chomczynski P, Sacchi N, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156
- [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
- [7] Cairns MJ, Murray V, et al. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Bio Techniques, 1994, 17: 914
- [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

(收稿日期: 1999-01-05; 修回日期: 1999-06-28)

作者简介: 陈瑞川, 男, 博士, 副研究员。

(上接第 205 页) 未见正常左卵巢。右卵巢正常, 右卵巢大小正常, 表面见有小米粒大小结节 4 个。冲洗腹腔液未查见癌细胞。取灰白色结节送快速病理报告为“恶性平滑肌肉瘤”。行根治性子宫切除, 阑尾切除加大网膜切除。腹腔内置卡铂 200 mg。术后 7 天拆线。术后病理报告: 左侧输卵管低分化腺癌, 左卵巢平滑肌肉瘤。子宫平滑肌瘤。大网膜、阑尾、子宫均未见累及。免疫组化结果支持左输卵管腺癌, 左卵巢平滑肌肉瘤。

讨论:

原发性输卵管腺癌(primary adenocarcinoma of the fallopian tube), 及卵巢平滑肌肉瘤(Leiomyosarcoma of the ovary) 均为女性生殖道极为少见的恶性肿瘤, 患者同侧卵巢及卵巢同时生长腺癌及平滑肌肉瘤更属罕见, 国内尚未见此报道。目前患者已行六个疗程化疗, 一般情况好, 影像学检查未发现转移灶, 仍在随访中。

(收稿日期: 2000-01-17; 修回日期: 2000-03-30)

作者简介: 戚丽, 女, 大学本科, 副主任医师。