

银染巢式 RT-PCR 检测胃癌 淋巴结微转移方法¹

陈瑞川¹ 陈路芸² 乔玉欢² 邱达泰³ 杨善民¹ 汪德耀²

(¹厦门大学抗癌研究中心 厦门 361005 ²厦门大学生物学系 厦门 361005

³福建医科大学医疗系 福州 350004)

摘要 以 Keratin 19 cDNA 的套式引物建立了巢式 RT-PCR 扩增 Keratin 19 mRNA 的体系及 PAGE-银染检测扩增产物的方法;对扩增体系进行优化后,分析了扩增特异性及检测敏感性,并对临床样品作了初步检测.结果表明:该扩增体系具有较好的特异性,其敏感性可达 10^{-6} μ g RNA,即可从 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.显示该法具有较好的可靠性.

关键词 胃癌转移, Keratin 19, RT-PCR, 银染

中国图书分类号 R 730.49

目前胃癌转移的临床检测主要靠病理切片检查,敏感性较差,一些胃周淋巴结内微小胃癌转移灶常被漏检^[1].近年有报道应用 RT-PCR 检测淋巴结癌微转移灶;其原理是选择肿瘤组织特异表达而淋巴组织不表达的基因,利用 RT-PCR 扩增检测该基因的表达产物(mRNA),可判断是否存在转移的癌细胞^[1].其中 Keratin 19 即可用于检测胃癌细胞淋巴转移的上皮组织特异表达基因^[2,3];它是角蛋白基因之一,在胃癌组织表达率为 100%^[4],而在淋巴结和外周血细胞中不表达^[2-4],利用 RT-PCR 技术检测胃周淋巴结总 RNA 中是否有 Keratin 19 mRNA,即可确定是否已发生胃癌细胞淋巴结微转移.本文采用 Keratin 19 cDNA 的套式引物建立巢式 RT-PCR 扩增 Keratin 19 mRNA 的体系,并以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)-银染检测扩增产物,敏感性和特异性均较好.

1 材料与方法

1.1 试剂及样品

试剂:有关修饰酶及内切酶均为 Promega 产品;相关生化试剂购自华美上海分公司;其余均为国产分析纯.

细胞株:人胃腺癌 MGC80-3 及人早幼粒白血病 HL-60 细胞株为本单位细胞生物学研究室保存;培养条件为:含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 PRMI 1640 (GIBCO) 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养传代.

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和非癌患者胃手术切除

标本: 胃及胃癌活检样品取自行胃镜检查患者, 并常规病理切片检查. 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 引物序列按文献[2], Keratin 19 的套式引物根据其 cDNA 序列并参照文献[2]以 DNASIS 软件系统设计, 引物序列如下:

AF 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'

AR 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'

KF1 5'-AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3'

KR1 5'-GAGGACCTTGGAGGCAGACA-3'

KF2 5'-CTGGCCTTGGGAAGACACACTG-3'

KR2 5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCAG-3'

其中, AF+AR 的扩增产物长为 154 bp, KF1+KR1 的扩增产物为 494 bp 的片段, 以此扩增产物为模板再用 KF2+KR2 扩增的产物长为 215 bp. 引物均由上海生物工程公司合成.

1.2 总 RNA 提取

按 Chomczynski 的一步法^[5]提取总 RNA.

1.3 逆转录

按文献方法^[6]以 AMV 逆转录酶及随机引物进行逆转录.

1.4 PCR 及巢式 PCR

β -actin 扩增及 Keratin 19 的第一轮扩增: 20 μ L 的体积含缓冲液、1 μ L 逆转录产物、2.0 mmol/L MgCl₂、100 μ mol/L dNTPs 12.5 pmol 的上下游引物(AF+AR 或 KF1+KR1) 及 1u Taq 酶, 95 变性 5 min 后进入 PCR 循环, 循环参数为 94 1 min、60 1 min、72 1 min, 40 个循环, 72 补齐 5 min; Keratin 19 的第二轮扩增体系为: 20 μ L 体积含 2 μ L 第一轮扩增产物、25 pmol 上下游引物(KF2+KR2), 其余成份和循环参数均同上. 扩增产物以 PAGE-银染分析.

1.5 PAGE-银染分析

聚丙烯酰胺凝胶厚为 0.6 mm, 加样量为 1~10 μ L, 150~200 V 电泳 1 h 后按报道的方法^[7]进行银染分析.

2 结果

2.1 PCR 系统及条件的优化

在 2 mmol/L MgCl₂ 浓度下, 以不同的退火温度进行 PCR 扩增 PAGE-银染分析结果见图 1; 可见 60 退火温度下扩增效果较好. 另选定 60 退火温度, 于 PCR 体系中加入不同浓度的 MgCl₂, 扩增后 PAGE-银染分析的结果见图 2; 显示最佳 MgCl₂ 浓度在 1.5~2.0 mmol/L 范围内. 故在后继的实验中, 均以 60 退火温度及 2.0 mmol/L MgCl₂ 浓度进行 PCR 扩增.

2.2 RT-PCR 的扩增特异性

图 2 所示为以 Keratin 19 的套式引物及 β -actin 的引物分别对 MGC80-3、胃癌组织、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, 再从 Keratin 19 及 β -actin 的扩增管各取 2 μ L 混合, 以 PAGE-银染分析. 结果显示: 胃、胃癌组织及细胞均有 Keratin 19 及 β -actin 的扩增产物, 而其余仅有 β -actin 扩增产物, 表明该扩增体系有较好的特异性.

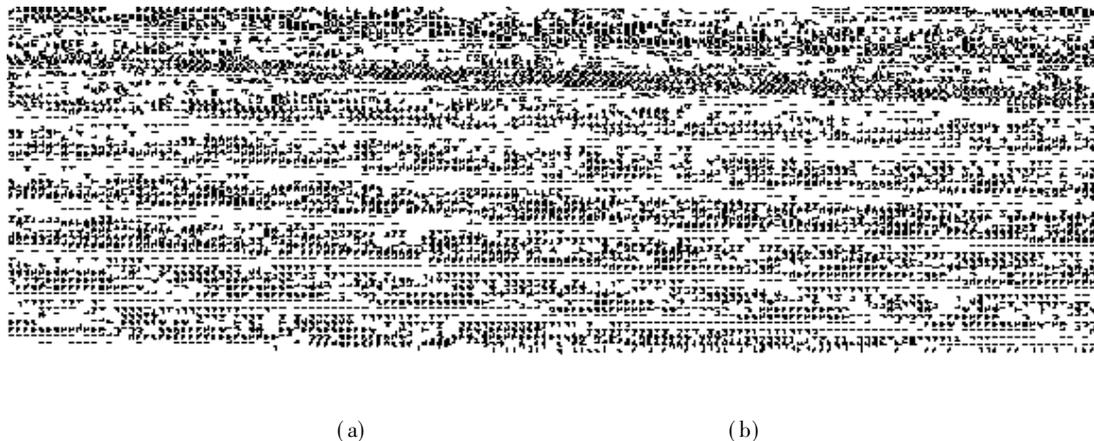


图1 退火温度(a)及 $MgCl_2$ (b)对 Keratin 19 RT-PCR 扩增效果的影响

M a: pBR322/Hae marker

Fig. 1 Effect of annealing temperature(a) and $MgCl_2$ concentration(b) on RT-PCR



图2 RT-PCR 的扩增特异性

M a: pBR322/Hae marker

1: MGC80-3; 2, 3: 胃癌组织; 4, 5: 胃组织; 6: HL-60; 7, 8: 正常淋巴结; 9, 10: 外周血细胞

Fig. 2 Amplification specificity of RT-PCR

2.3 RT-PCR 的检测敏感性

将 MGC80-3 的逆转录产物($1 \mu g/\mu L$)按 10 倍稀释后各取 $1 \mu L$,再各加入来自 HL-60 逆转录产物 $1 \mu L$ (相当于 $0.1 \mu g$ 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,产物以 PAGE-银染分析,结果见图 3;显示检测敏感性达 $10^{-6} \mu g$ RNA.若以 $10 \mu g^{-6}$ 的 MGC80-3 RNA 相当于 1 个 MGC80-3 细胞, $0.1 \mu g$ 的 HL-60 RNA 相当于 10^5 个 HL-60 细胞,则该敏感性相当于从 10^5 个白细胞或淋巴细胞中检测出 1 个胃癌细胞.

2.4 临床样品的 RT-PCR 分析结果

用 Keratin 19 套式引物及 β -actin 引物分别对部分经病理检查诊断过的、来自胃癌(转移阳性, 12 个)及非胃癌患者(转移阴性, 9 个)的胃周淋巴结样品进行 RT-PCR 检测.结果显示转移阳性的样品 Keratin 19 扩增均阳性,而阴性者只有 β -actin 的扩增带,该结果与病理检查

结果一致,表明该扩增体系具有较好的可靠性.图 4 所示为部分样品的检测结果.

3 讨论

Keratin 19 已被证实在淋巴等非上皮细胞中不表达,而胃癌细胞中表达率达 100%^[2-4];该特性使之成为一种较好的检测胃癌淋巴结转移的标记基因.本文在参照文献[2,3]的基础上建立了巢式 RT-PCR 方法及 PAGE-银染系统,不仅具有较好的特异性,也提高了检测的敏感性. Mori 等报道^[8]以巢式 RT-PCR 扩增癌胚抗原(CEA) mRNA 检测胃癌淋巴结转移,可从 10⁴ 个淋巴细胞检出 1 个胃癌细胞.我们以系列

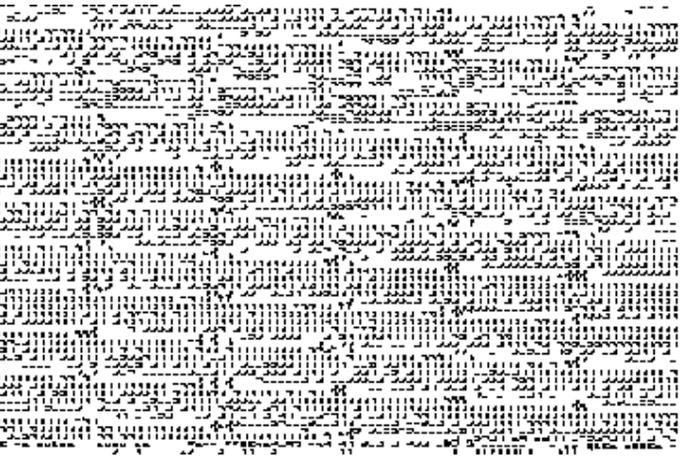


图 3 RT-PCR 的检测敏感性分析

M: pBR 322/Hae marker; 1 ~ 7: 分别相当于 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 及 10⁻⁷ μg MGC80-3 的 RNA

Fig. 3 Test of detection sensitivity of RT-PCR

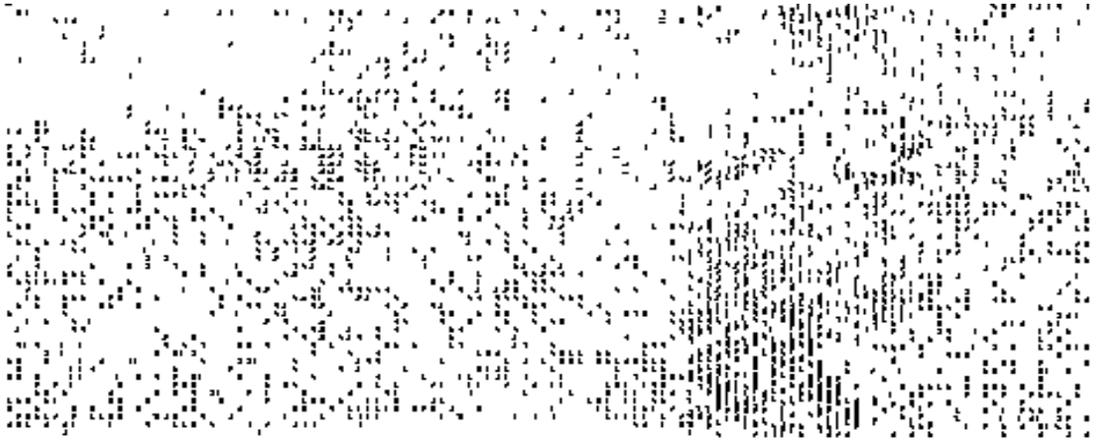


图 4 部分胃周淋巴结 RT-PCR 检测的结果

M a: pBR 322/hae marker
1 ~ 11: 取自胃癌患者的胃周淋巴结样品
12 ~ 18: 取自非胃癌患者的胃周淋巴结样品

Fig. 4 RT-PCR detection results of portion gastric axillary lymph nodes

稀释的样品进行 RT-PCR 扩增检测的结果显示其敏感性相当于可从 10⁵ 个淋巴细胞检出 1 个胃癌细胞,敏感性较 Mori 的方法高 10 倍,也较 Noguchi 等人报道^[2]的常规 RT-PCR 扩增 Keratin 19 mRNA 法高.对 12 例胃癌转移阳性及 9 例转移阴性的胃周淋巴结样品检测的结果与病理检查结果相符,表明该方法具有一定的可靠性,但其临床实用性还有待于更多的临床验证.

参 考 文 献

- 1 江继发,魏海明. 检测肿瘤转移指标的临床意义. 国外医学肿瘤分册, 1998, 25: 224~226
- 2 Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H et al. Detection of gastric cancer micrometastases in axillary lymph nodes by amplification of Keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Jpn J Cancer Res, 1996, 87: 650~654
- 3 Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes using polymerase chain reaction. Cancer Res, 1994, 54: 2 986~2 990
- 4 Moll R, Franke WW, Schiller DL et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 1982, 32: 11~24
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 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. 细胞生物学杂志, 1998, 20: 38~41
- 7 Cairns M J, Murry V. Rapid silver staining and recovery of PCR products speared on polyacrylamide gels. Biotechniques, 1994, 17: 209~214
- 8 Mori M, Mimori K, Inoue H et al. Detection of cancer micrometastases in Lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res, 1995, 55: 3 417~3 420

Studies on the Method for Detecting Gastric Cancer Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Nest RT-PCR and Silver Staining

Chen Ruichuan¹ Chen Luyun² Qiao Yuhuan²
Qiu Datai³ Yang Shanmin¹ Wang Deyao²

(¹Cancer Res. Center of Xiamen Univ., Xiamen 361005, ²Dept. of Biol., Xiamen Univ., Xiamen 361005, ³Dept. of Med. of Fujian Med. Univ., Fuzhou 350004)

Abstract Keratin 19 is one of cytokeratin genes which is expressed in gastric tissue and gastric carcinoma, but unexpressed in lymph tissue. With this different expression pattern, the gastric cancer micrometases in gastric axillary lymph nodes can be estimated by RT-PCR method for detecting the Keratin 19 mRNA in total RNA from the nodes. Described here is a RT-PCR system for detecting Keratin 19 mRNA with nest primers and a PAGE-silver staining method for showing amplification products. The test results showed that this system possessed a good specificity and high sensitivity of detecting 10^{-6} μ g RNA or one gastric cancer cell from 10^5 lymph cells. The detection results with RT-PCR performed on clinical gastric axillary lymph nodes were correspond to the results of pathological examination, which suggested a good application prospects in clinical.

Key words Gastric cancer metastases, Keratin 19, RT-PCR, Silver staining