

RT-PCR法检测肾癌组织中MN/CAIX基因表达

目前对肾癌的早期诊断缺乏有效的手段, 其中的一个重要原因是缺乏特异性的肿瘤标记物。近年来, 国外的研究[1]发现碳酸酐酶IX (MN/CAIX) 在一些肿瘤中有特异性的表达, 其中也包括肾癌。MN/CAIX被认为是一种肿瘤相关抗原, 其特异性较高, 在肿瘤的诊断、筛选以及生物治疗方面具有潜在的应用前景。国内这方面的研究较少。我们利用RT-PCR 的方法检测肾癌组织和正常肾组织中MN/CAIX mRNA的表达, 并通过序列分析来验证该方法的准确性, 为进一步探讨MN/CAIX基因在肾癌中的表达提供可靠的方法, 同时对于建立更加特异和敏感的肾癌分子生物学诊断方法有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器和试剂 美国PE公司GeneAmp PCR System9700扩增仪, BECKMAN低温离心机; 美国Invitrogen 公司TRIzol试剂, ThermoScript RT-PCR Syst试剂盒, 德国QIAGEN公司QIAquick胶回收试剂盒。ExTaq酶购于TaKaRa公司。 MN/CAIX引物由上海申友生物工程公司合成。实验用器械如研钵、EP管、TIP枪头均用DEPC处理以去除残存的RNA酶。

1.1.2 标本来源 5例肾癌组织标本取自2002年12月~2003年6月在南方医院行肾癌根治手术的患者, 其中男性4例, 女性1例。均经过病理检查证实, 其中3例为透明细胞癌, 2例为颗粒细胞癌。在肿瘤原发灶上切取200 mg左右组织作为癌组织标本, 原发灶远处切取正常肾组织作为对照。标本切取后立即放入液氮冻存, 防止RNA降解。

1.2 方 法

1.2.1 RNA的提取 用美国Invitrogen 公司TRIzol试剂提取肾癌和正常肾组织的总RNA, 参照试剂盒使用说明进行。产物用核酸定量仪做定量检测。

1.2.2 逆转录和PCR扩增 使用美国PE公司GeneAmp PCR System 9700扩增仪, Invitrogen 公司的ThermoScript RT-PCR Syst试剂盒进行逆转录。具体步骤参照试剂盒说明书。从GeneBank中检索出人MN/CAIX基因序列, 设计MN/CAIX引物。上游引物: 5'-GTCTCGCTTGAAGAAATCG-3', 下游引物: 5'-A-GAGGGTGTGGAGCTGCTTA-3。同时设计内对照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因的引物, 上游引物: 5'-CTGTCGATGGAAGATCATC-3', 下游引物: 5'-GCTCGTGACGTCTAAG ATC-3'。两对引物在同一个反应体系中进行PCR扩增, 30 μ l体系, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性1 min, 94 $^{\circ}$ C变性25 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 35次循环。末次循环后72 $^{\circ}$ C再延伸5 min。反应完毕后2%琼脂糖凝胶电泳, 取反应产物10 μ l加样, 100 V电压, 溴化乙锭染色, UVP凝胶成像系统观察结果

1.2.3 PCR产物的克隆和序列分析 在紫外灯下回收阳性PCR条带并纯化。纯化后的PCR产物与pMD18-T载体连接, 连接产物全部转化JM109宿主菌。蓝白斑筛选, 挑取白斑, 扩大培养后, 用MN/CAIX特异性引物进行PCR扩增筛选, 挑选阳性克隆送测序, 测序由上海基康公司利用DNA全自动分析仪完成。BLAST分析进行同源

性比较。

2 结果

2.1 总RNA提取结果

NanoDrop DNA/RNA定量仪测总RNA(质量)浓度,总RNA浓度为 $2.043 \sim 3.915$ ng/ μ l,中位浓度为 3.451 ng/ μ l; A260/A280为 $1.8 \sim 2.2$ 。

2.2 PCR结果

经过UVP凝胶成像系统观察RT-PCR反应产物(图1),在5例肾癌组织标本中有4例扩增出预计大小的DNA片段。其中病理结果为透明细胞癌的3例中均有阳性条带,颗粒细胞癌中1例为阳性、1例为阴性;正常肾组织中均为阴性。

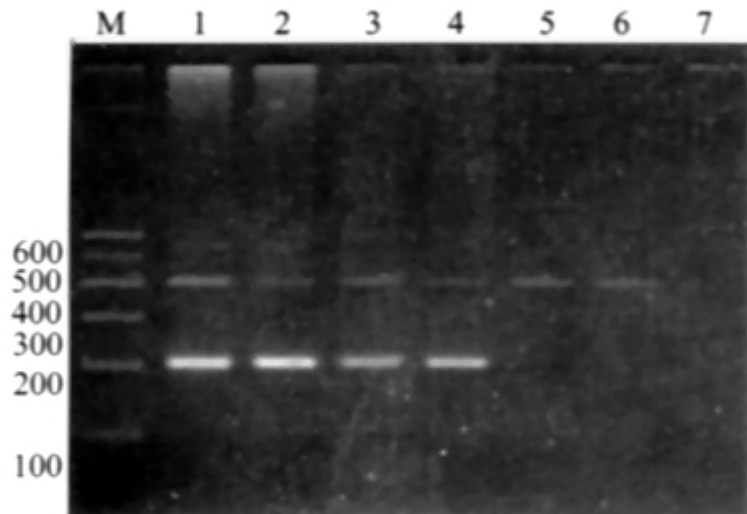


图1 反转录PCR结果

Fig.1 Result of RT-PCR

Lanes 1-3: Clear-cell renal cell carcinoma; Lanes 4-5: Granular renal cell carcinoma; Lane 6: Normal renal tissues; Lane 7: Negative control; Lane M: Marker 100 bp DNA ladder

2.3 DNA测序结果

DNA测序结果可见DNA序列图谱清晰、可读性强。DNA测序结果进行BLAST分析,可见该扩增序列与GenBank中MN/CAIX基因(基因号: NM_001216)中的921~1120之间的序列完全一致。

3 讨论

肾癌又称肾细胞癌,是成人肾脏最常见的恶性肿瘤。其发病率居泌尿系统肿瘤的第2位,有呈逐年上升的趋势[1]。大约1/3的病人在临床诊断为肾细胞癌时已经有转移存在,另外有40%的病人在1年内将出现转移。肾细胞癌一旦转移,5年生存率<10%,平均存活时间不到2年[2]。由于肾癌早期缺乏典型的临床症状,目前肾肿瘤的诊断主要依靠B超、CT、MRI等影像学方法并结合临床医生的经验,对于肿瘤的早期发现,良、恶性的区分,转移灶的确定,手术后局部复发的诊断缺乏有效的手段。而早期发现等对于治疗方法的选择和预后的判断具有决定性的作用。因此国内外许多学者正致力于寻找具有较高敏感性和特异性的诊断方法[3][4]。

MN/CAIX最早是在人宫颈癌HeLa细胞系中发现的,当时命名为MN,是位于细胞膜表面的糖蛋白[5]。其后发现该蛋白有与碳酸酐酶(CA)相似的结构,并被确认为是一种碳酸酐酶的异构酶,命名为CAIX[6]。MN/CAIX

的基因结构和蛋白结构已经基本清楚。MN/CAIX是分布于细胞膜的糖蛋白,相对分子质量为58 000/54 000,由459个氨基酸构成[7]。MN/CAIX基因位于9p12-13[8]。根据目前国外的研究,MN/CAIX被认为是一种肿瘤相关抗原,在宫颈癌中有特异性表达[9][10]。部分学者认为MN/CAIX存在致癌基因样特征,在调控细胞增殖、转化方面有重要的作用,有诱导恶性表型的作用[11][12]。近来应用免疫组化的方法发现MN/CAIX在多种肿瘤中有表达[13][14],其中也包括肾癌[15][16]。

本研究应用RT-PCR技术检测肾癌组织和正常肾组织标本各5例,其中4例肾癌标本有特异性条带出现,正常肾组织无特异性条带出现,该结果与文献报道基本相符合[14][16]。RT-PCR阳性结果经过DNA序列分析与MN/CAIX的目的片段吻合,证明该方法的可靠性。因为MN/CAIX可以作为肾癌的肿瘤相关抗原和标记物。而且从理论上讲,RT-PCR法可以检测到有基因表达的单个瘤细胞,其灵敏性是常规影像学检查无法达到的。所以利用该方法检测肾癌组织中MN/CAIX基因的表达在肾癌的早期诊断、进展程度的监测、治疗效果的评价、肿瘤复发的诊断以及生物治疗方面具有非常好的应用前景。目前正在扩大病例收集范围,除了检测肾癌原发灶组织,还检测病人全血、淋巴结等,期望找到一种比较简便、实用的检测方法。

参考文献:

- [1] Mulders P, Figlin R, de Kernion JB, et al. Renal cell carcinoma: re-cent progress and future directions[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5189-95.
- [2] De Kernion JB. Renal tumors[A]. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, et al. *Campbell's Urology*[M], 6th edition. Philadelphia: Elsevier Science, 1993, 1294-342.
- [3] 陈 彤, 郑少斌, 谭万龙, 等. 癌组织树突状细胞浸润与肾癌预后及转移的关系[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(9): 833-4.
- Chen T, Zheng SB, Tan WL, et al. Association of dendritic cell infiltration with prognosis and lymph node metastasis of renal cell carcinoma[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(9): 833-4.
- [4] 李黎波, 罗荣城. 癌性贫血患者血清促红细胞生成素的检测及临床意义[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(9): 954-5.
- Li LB, Luo RC. Clinical significance of serum erythropoietin detection in patients with cancer-related anemia[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(9): 954-5.
- [5] Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens[J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(2): 268-74.
- [6] Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, et al. Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases[J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(3): 1497-506.
- [7] Pastorek J, Pastorekova S, Cakkebaut I, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment[J]. *Oncogene*, 1994, 9(10): 2877-88.
- [8] Opavsky R, Pastorekova S, Zeinik V, et al. MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships[J]. *Genomics*, 1996, 33(3): 480-7.
- [9] Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of the MN antigen in cervical Papanicolaou smears is an diagnostic biomarker of cervical dysplasia[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996, 5(7): 549-57.
- [10] Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al. Down-regulation of trans-membrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(21): 12596-601.
- [11] Kaluzova M, Pastorekova S, Pastorek J, et al. P53 tumour suppressor modulates

transcription of the TATA-less gene coding for the tumour-associated carbonic anhydrase MN/CA IX in MaTu cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1491(1-3): 20-6.

[12]Zavada J, Zavadova Z, Pastorek J, et al. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(11): 1808-13.

[13]Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, et al. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(8): 1276-82.

[14]Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, et al. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(16): 3660-8.

[15]McKiernan J, Buttyan R, Bander N, et al. Expression of the tumour-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(6): 2362-65.

[16]McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9[J]. *Cancer*, 1999, 86(3): 492-7.

参考文献:

[1]Mulders P, Figlin R, de Kernion JB, et al. Renal cell carcinoma: recent progress and future directions[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5189-95.

[2]De Kernion JB. Renal tumors[A]. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, et al. *Campbell's Urology*[M], 6th edition. Philadelphia: Elsevier Science, 1993, 1294-342.

[3]陈 彤, 郑少斌, 谭万龙, 等. 癌组织树突状细胞浸润与肾癌预后及转移的关系[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(9): 833-4.

Chen T, Zheng SB, Tan WL, et al. Association of dendritic cell infiltration with prognosis and lymph node metastasis of renal cell carcinoma[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(9): 833-4.

[4]李黎波, 罗荣城. 癌性贫血患者血清促红细胞生成素的检测及临床意义[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(9): 954-5.

Li LB, Luo RC. Clinical significance of serum erythropoietin detection in patients with cancer-related anemia[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(9): 954-5.

[5]Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens[J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(2): 268-74.

[6]Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, et al. Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases[J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(3): 1497-506.

[7]Pastorek J, Pastorejiva S, Cakkebaut I, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment[J]. *Oncogene*, 1994, 9(10): 2877-88.

[8]Opavsky R, Pastorekova S, Zeinik V, et al. MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships[J]. *Genomics*, 1996, 33(3): 480-7.

[9]Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of the MN antigen in cervical Papanicolau smears is an diagnostic biomarker of cervical dysplasia[J]. *Cancer Epidemiol Biomar Prev*, 1996, 5 (7): 549-57.

[10]Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al. Down-regulation of trans-membrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(21): 12596-601.

[11]Kaluzova M, Pastorekova S, Pastorek J, et al. P53 tumour suppressor modulates transcription of the TATA-less gene coding for the tumour-associated carbonic anhydrase MN/CA IX in MaTu cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1491(1-3): 20-6.

[12]Zavada J, Zavadova Z, Pastorek J, et al. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(11): 1808-13.

[13]Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, et al. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(8): 1276-82.

[14]Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, et al. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(16): 3660-8.

[15]McKiernan J, Buttyan R, Bander N, et al. Expression of the tumour-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(6): 2362-65.

[16]McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9[J]. *Cancer*, 1999, 86(3): 492-7.