



应用激光显微分割术结合PCR-SSCP技术诊断裸鼠移植瘤模型肺微转移癌灶

对微转移癌灶和良性结节性病灶在常规HE切片上进行鉴别诊断非常困难。本研究采用激光显微分割结合PCR-SSCP技术分析K-ras基因有无点突变,从分子水平对人肺癌裸鼠移植模型肺微转移癌灶和良性结节病灶进行鉴别诊断,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 3~4周龄BALB/c裸鼠12只,雌雄各半,平均体质量18 g(购自加州大学Davis动物实验中心)。背部皮下接种0.3 ml人肺癌细胞株A549(1×10^6 个细胞/ml),8周后,处死裸鼠,取双侧肺组织,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,二甲苯脱蜡,酒精透明,HE染色。

1.1.2 主要试剂及仪器 蛋白酶K、PCR反应试剂盒[包括dNTP、PCR缓冲液、MgCl₂、Taq酶]为美国Promega公司产品;聚丙烯酰胺凝胶(美国JT Baker公司);银染试剂盒(美国Bio-Rad公司)产品;PixCell 200激光显微细胞分割仪(美国Arcturus公司)。

1.2 方法

1.2.1 激光显微细胞分割仪分割细胞 显微镜下观察切片,2例裸鼠肺部出现小结节性病灶,标记可疑的结节性病灶, PixCell 200激光显微细胞分割仪下,选择可疑靶细胞,激光分割,转移到1.5 ml 已含有30 μl DNA消化液(蛋白酶K 0.2 mg/ml、1 mol/L Tris 2.5 ml、0.5 mol/L EDTA 100 μl , 250 μl Tween 20和47.15 ml 蒸馏水)的eppendorf管内,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性10 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 PCR-SSCP银染

1.2.2.1 PCR引物及反应条件 实验采用K-ras基因第12外显子2对引物。

首次PCR P1为:5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGA-3',P2为:5'-GCACCAGTAATATGCA-TA-3'。PCR扩增条件:反应液体积50 μl ,其中4 \times dNTP 2 μl ,Taq酶1.0 U,10 \times buffer 2 μl ,引物各50 pmol/L。95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,50 μl ,30个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

再次PCR P1为:5'-GACTGAATATAAAC-TTG TGGT-3',P2为:5'-TGTTGGATCATATTCGTC-3'。PCR扩增条件:取首次PCR反应产物1 μl ,反应液体积同上,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 1s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,20个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.2.2 SSCP 根据琼脂糖凝胶电泳检测结果,取1 μl 二次PCR反应产物,加适当的蒸馏水与等体积的加样缓冲液(100%甲酰胺,0.05%二甲苯青,0.05%溴酚兰)混合,以已知AGT和TGT突变的肺癌细胞株及正常肺组织作为对照。90 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min,立即置冰浴。聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压200 V,常温下3 h。

1.2.2.3 银染 采用银染试剂盒。10%乙醇+冰乙酸+FEC固定20 min,银染色10~20 min,10%乙酸终止固定10 min。冲水晾干封膜。

肺部组织切片中见由多边形细胞构成的微结节性病灶(图1, 2), 图1示病灶细胞有一定异型性, 但细胞数量少, HE染色为可疑转移癌细胞灶。图2细胞无异型性, 考虑为良性增生性病灶。

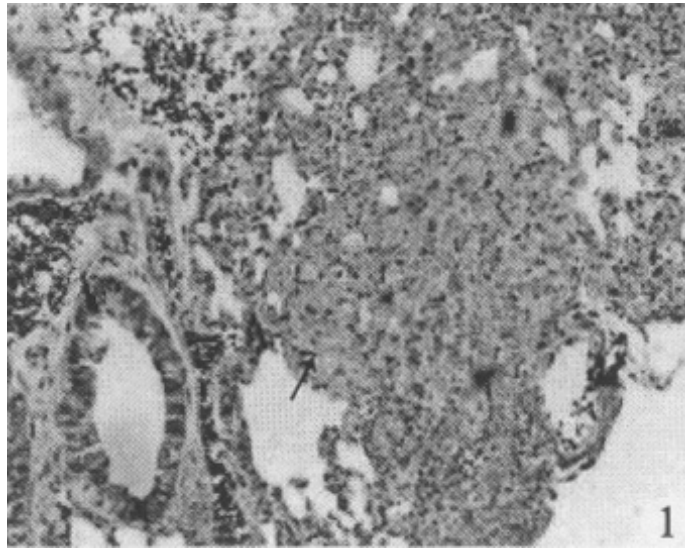


图1 裸鼠移植瘤模型中肺可疑转移癌细胞灶 (HE, $\times 100$)

Fig.1 Suspect metastatic cancer cell foci in the lung of nude mice with the implanted tumors (HE, $\times 100$)

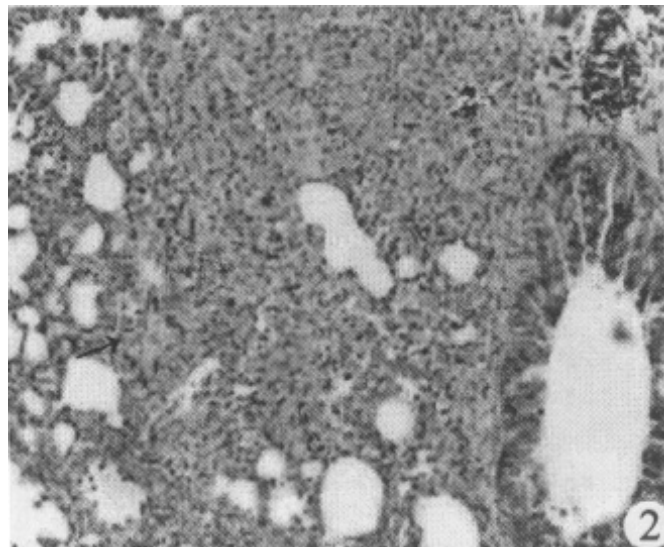


图2 裸鼠移植瘤模型中肺良性增生性病灶 (HE, $\times 100$)

Fig.2 Benign proliferative lesion in the lung of nude mice with the implanted tumor (HE, $\times 100$)

HE染色的组织切片中可疑转移癌灶出现K-ras基因突变, 突变类型为AGT, 而考虑为良性增生性病灶未见K-ras基因突变, 为野生型K-ras基因(GGT) (图3)。

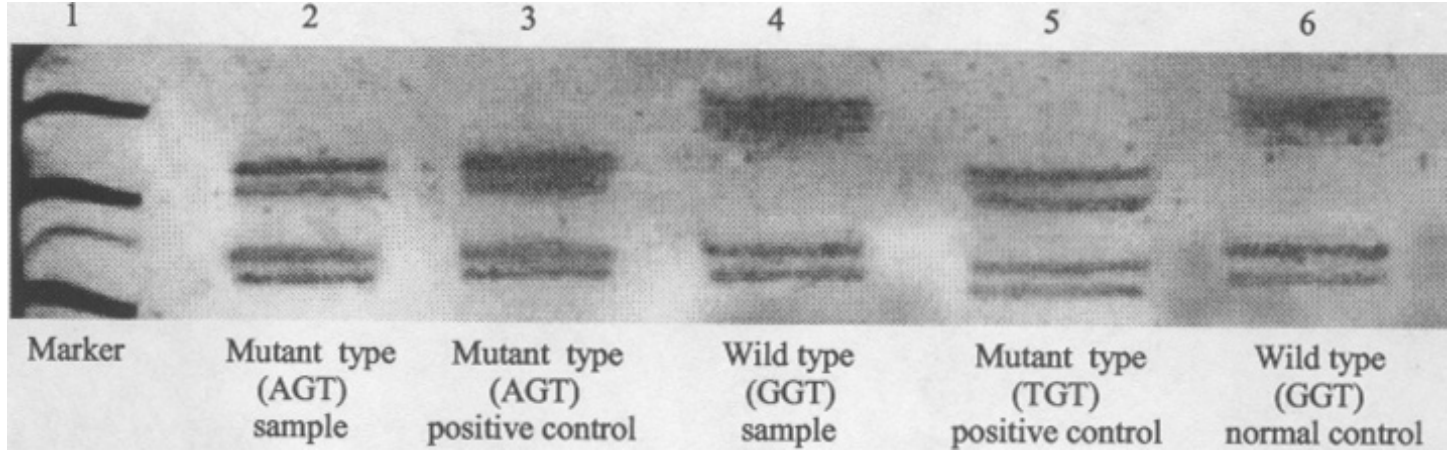


图3 裸鼠移植瘤模型肺部病灶细胞的单链构象多态性分析
 Fig.3 Analysis of single-strand conformation polymorphism of the tumor cells in the lung of the tumor-bearing nude mice

3 讨论

显微分割技术是20世纪90年代初出现的一项在显微镜下从组织切片上分割靶细胞的新技术，目前已成为肿瘤细胞分子生物学研究的重要工具。显微切割技术也从最初的刀片挖取、静电吸取等手工操作，发展到今天的全自动激光电脑获取。Emmert-Buck (1996)和Bonner(1997)等分别在Science杂志上报道了激光显微分割技术的原理及其应用[1][2]。我们在实际操作过程中体会到激光显微分割技术较其他技术而言操作程序更方便、高效、准确，但由于激光显微切割设备较昂贵，目前国内尚不能得到广泛应用，有关该技术的报道较少。

激光显微分割技术可作为肿瘤研究和临床病理诊断工作中的重要工具。Chang[3]等应用激光显微分割技术结合DNA序列分析发现I期胰腺癌中常见K-ras基因12密码子的突变；Lax[4]等用激光显微分割技术结合PCR技术检测p53基因和K-ras基因有无突变，以此作为子宫内膜样癌和浆液性腺癌鉴别诊断的分子病理学依据；Milchgrub[5]等报道1例十二指肠类癌术后发现头皮肿瘤和宫颈淋巴结转移瘤，采用激光显微分割技术分别切割十二指肠类癌、头皮肿瘤及宫颈淋巴结转移瘤组织并提取DNA，用22个多态微卫星灶标记物PCR技术分析有无杂合子丢失和微卫星灶改变，结果发现3组标本显示相同的微卫星灶改变，证实头皮肿瘤及宫颈淋巴结转移瘤细胞的原发灶均来自十二指肠。

PCR-SSCP银染技术是在PCR的基础上进行SSCP，再对电泳胶银染显色，该技术目前已成为基因突变(如p53基因、K-ras基因)和DNA多态性的快速筛选和检测的重要手段[6][7][8]。

Dillon[9]等采用激光显微分割技术结合PCR-SSCP技术对临床结肠癌标本中p53基因和K-ras基因进行了分析，认为两技术的结合能快速而有效地完成癌基因的分析。本研究应用该技术通过分析K-ras基因有无突变及其突变类型，对人肺癌裸鼠移植模型肺微转移癌灶和良性结节性病灶进行了鉴别诊断，结果显示可疑转移癌灶细胞存在K-ras基因突变，突变类型为AGT，而良性结节性病灶细胞无K-ras基因突变，为野生型K-ras基因(GGT)。

综上所述，激光显微分割技术结合PCR-SSCP银染技术分析K-ras基因有无突变，对微转移癌灶和良性结节性病灶的鉴别诊断有重要价值。

参考文献：

- [1] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection[J]. Science, 1996, 274(5289): 998-1001.
- [2] Bonner RF, Emmert-Buck MR, Cole K, et al. Laser capture microdissection:

molecular analysis of tissue[J]. Science, 1997, 278 (5342): 1481-3.

[3] Chang MC, Chang YT, Wu MS, et al. K-ras mutation at codon 12 in stage I pancreatic adenocarcinoma: analysis by laser capture microdissection and direct sequencing [J]. J Formos Med Assoc, 2001, 100(5): 352-4.

[4] Lax SF, Kendall B, Tashiro H, et al. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways[J]. Cancer, 2000, 88(4): 814-24.

[5] Milchgrub S, Wistuba II, Kim BK, et al. Molecular identification of metastatic cancer to the skin using laser capture microdissection: a case report[J]. Cancer, 2000, 88(4): 749-54.

[6] Yamashita K, Tatebayashi T, Shinoda H, et al. Simplified rapid non-radioactive PCR-SSCP method applied to K-ras mutation analysis[J]. Pathol Int, 1996, 46(10): 801-4.

[7] Park YK, Park HR, Chi SG, et al. Overexpression of p53 and absent genetic mutation in clear cell chondrosarcoma[J]. Int J Oncol, 2001,19(2): 353-7.

[8] Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C, et al. Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7264-7.

[9] Dillon D, Zheng K ,Costa J. Rapid, efficient genotyping of clinical tumor samples by laser capture microdissection/PCR/SSCP[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3): 195-200.

参考文献:

[1] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection[J]. Science, 1996, 274(5289): 998-1001.

[2] Bonner RF, Emmert-Buck MR, Cole K, et al. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue[J]. Science, 1997, 278 (5342): 1481-3.

[3] Chang MC, Chang YT, Wu MS, et al. K-ras mutation at codon 12 in stage I pancreatic adenocarcinoma: analysis by laser capture microdissection and direct sequencing [J]. J Formos Med Assoc, 2001, 100(5): 352-4.

[4] Lax SF, Kendall B, Tashiro H, et al. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways[J]. Cancer, 2000, 88(4): 814-24.

[5] Milchgrub S, Wistuba II, Kim BK, et al. Molecular identification of metastatic cancer to the skin using laser capture microdissection: a case report[J]. Cancer, 2000, 88(4): 749-54.

[6] Yamashita K, Tatebayashi T, Shinoda H, et al. Simplified rapid non-radioactive PCR-SSCP method applied to K-ras mutation analysis[J]. Pathol Int, 1996, 46(10): 801-4.

[7] Park YK, Park HR, Chi SG, et al. Overexpression of p53 and absent genetic mutation in clear cell chondrosarcoma[J]. Int J Oncol, 2001,19(2): 353-7.

[8] Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C, et al. Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7264-7.

[9] Dillon D, Zheng K ,Costa J. Rapid, efficient genotyping of clinical tumor samples by laser capture microdissection/PCR/SSCP[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3): 195-200.

