

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

郭琳琅¹ 郭颖¹ 肖莎¹ ERICKLAU² 第一军医大学珠江医院病理科 广东 广州 510282 美国加州大学 DAVIS 癌症研究中心 冤

摘要 目的 探讨激光显微细胞分割术结合 PCR-SSCP 技术对微转移癌灶进行分子诊断的价值 方法 采用激光显微细胞分割技术分离裸鼠移植瘤模型肺部可疑病灶细胞 提取 DNA 二次 PCR 扩增 放射性同位素 SSCP 技术分析 K-ras 基因有无点突变 结果 肺微转移癌灶细胞出现 K-ras 基因突变(密码子 12) 突变类型为 AGT 而良性结节病灶未见 K-ras 突变 显示野生型 K-ras 基因 (GGT) 结论 激光显微细胞分割术结合 PCR-SSCP 技术对肺部可疑微转移癌灶进行分子诊断有重要帮助

关键词 激光显微细胞分割术 PCR-SSCP 转移癌 / 诊断

中图分类号 361.3 文献标识码 文章编号 000-2588 003 07-0725-03

Identification of lung micrometastatic tumor foci in nude mice with implanted tumor using laser capture microdissection and PCR-single-strand conformation polymorphism

GUOLin-lang¹, GUOYing¹, XIAOSha¹, DERICKLAU²

¹Department of Pathology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²University of California, Davis Cancer Center, California, USA

Abstract: Objective To assess the value of the laser capture microdissection (LCM) combined with polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique for diagnosing micrometastatic cancer cells in the lung of nude mice with implanted tumor. Methods Isolation of the cells from the suspected tumor loci in the lung of nude mice with implanted tumors was performed using laser capture microdissection technique, and the genomic DNA extracted from the cells was amplified by 2 sequential PCRs. Non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism (SSCP) was subsequently performed to analyze the point mutation of K-ras gene. Results K-ras gene (codon 12) mutation in AGT was identified in the suspected metastatic cancer cells but not in the benign nodular lesion, where wild type K-ras gene (GGT) was detected. Conclusion The utilization of LCM combined with PCR-SSCP technique may serve as a crucial aid for molecular diagnosis of morphologically suspicious cancer cell populations.

Key words: laser capture microdissection; PCR-SSCP; metastatic cancer / diagnosis

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 10⁶ 个细胞 / ml 7 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 连续切片 二甲

苯脱蜡 酒精透明 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 JTBaker 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 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 滋 DNA 消化液(蛋白酶 K 0.2 mg/ml 1 mol/L Tris 2.5 ml 10.5 mol/L EDTA 100 滋 50 滋 Tween 20 和 47.15 ml 蒸馏水) 的 eppendorf 管内 益水浴过夜 5 益加热变性 10 min 20 益保存备用

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

收稿日期 003-02-17

作者简介 郭琳琅 1962 冤男 安徽阜阳人 1991 年毕业于中山医科大学 硕士 副教授 主任医师 电话 20-61643495 冤-mail: linlangg@yahoo.com

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癌

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技术目前已成为基因突变和 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

Dillon 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 基因进行了分析人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瘤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 基因突变野生型 K-ras 基因

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

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

crodissection: molecular analysis of tissue. Science, 1997, 278(5342): 1481-3.
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. Formos Med Assoc, 2001, 100(5): 352-4.
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. Cancer, 2000, 88(4): 814-24.
Milchgrub S, Wistuba I, Kim BK, et al. Molecular identification of metastatic cancer to the skin using laser capture microdissection: a case report. Cancer, 2000, 88(4): 749-54.
Yamashita K, Tatebayashi T, Shinoda H, et al. Simplified rapid non-radioactive PCR-SSCP method applied to K-ras mutation analysis. Pathol Int, 1996, 46(10): 801-4.
Park YK, Park HR, Chi SG, et al. Overexpression of p53 and absent genetic mutation in clear cell chondrosarcoma. J Oncol, 2001, 19(2): 353-7.
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. Cancer Res, 2001, 61(19): 7264-7.
Dillon D, Zheng K, Costa J. Rapid, efficient genotyping of clinical tumor samples by laser capture microdissection/PCR/SSCP. Mol Pathol, 2001, 70(3): 195-200.

上接 724 页

本病提供了可供参考的依据应当指出的是在 KFD 病灶内坏死显著且受累区域中性粒细胞却很少或缺乏这是否与 KFD 病因特殊机体免疫表现出的细胞反应不同有关

病变淋巴结内细胞死亡是 KFD 最突出的特征本病坏死区中含有核碎片凋亡细胞组织细胞和少数小淋巴细胞所有病例受累区域均可观察到 CD8 细胞表达有学者认为 KFD 病灶中细胞坏死是由于 CD8 毒性 T 淋巴细胞介导的凋亡所致 CD8 细胞既是靶细胞又是效应细胞而细胞表达数目的多少与疾病的病程有关早期 CD8 细胞丰富晚期则减少

本病易误诊为 T 或 B 细胞淋巴瘤误诊的原因有病变区多个病灶相互融合淋巴窦消失病变区组织细胞欠成熟不规则局部出现免疫母细胞样单核细胞可见核分裂像本病与淋巴瘤的鉴别要点是 KFD 病变区组织细胞 CD68/MPO 淋巴细胞

呈灶状阳性细胞及 NK 细胞均呈散在阳性而淋巴瘤则呈 T 细胞或 B 细胞的单克隆性表达

本研究结果提示免疫组化表型分析在 KFD 疾病的诊断及鉴别诊断中有重要的参考价值

参考文献

Mugnaini EN, Watson T, Guccion J, et al. Kikuchi disease presenting as a flu-like illness with rash and lymphadenopathy. Am J Med Sci, 2003, 325(1): 34-7.
Kuo TT. Kikuchi's disease (histiocytic necrotizing lymphadenitis). A clinicopathologic study of 79 cases with an analysis of histologic subtypes, immunohistology, and DNA ploidy. Am J Surg Pathol, 1995, 19(7): 798-809.
Pileri SA, Facchetti F, Ascani S, et al. Myeloperoxidase expression by histiocytes in Kikuchi's and Kikuchi-like lymphadenopathy. Am J Pathol, 2001, 159(3): 915-24.
Ohshima K, Shimazaki K, Kume T, et al. Perforin and Fas pathways of cytotoxic T-cells in histiocytic necrotizing lymphadenitis. Histopathology, 1998, 33(5): 471-8.