

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袁颖¹袁肖莎¹袁ERICKLAU²渊第一军医大学珠江医院病理科袁广东 广州 510282曰美国加州大学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遥方法 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 袁二次 PCR 扩增袁非放射性同位素 SSCP 技术分析 K-ras 基因有无点突变遥结果 肺微转移癌灶细胞出现 K-ras 基因突变(密码子 12)袁突变类型为 AGT 袁而良性结节病灶未见 K-ras 突变袁显示野生型 K-ras 基因 (GGT) 遥结论 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遥

关键词 激光显微细胞分割术曰PCR-SSCP 曰转移癌 / 诊断

中图分类号 R361.3 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)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 wildtype 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遥本研究采用激光显微分割结合 PCR-SSCP 技术分析 K-ras 基因有无点突变袁从分子水平对人肺癌裸鼠移植瘤模型肺微转移癌灶和良性结节病灶进行鉴别诊断袁报告如下遥

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 3~4 周龄 BALB/c 裸鼠 12 只袁雄各半袁平均体质量 18g (购自加州大学 Davis 动物实验中心)遥背部皮下接种 0.3ml 人肺癌细胞株 A549 渊伊 0⁶ 个细胞 / ml 袁周后袁处死裸鼠袁取双侧肺组织袁 0% 中性福尔马林固定袁石蜡包埋袁滋 连续切片袁二甲

收稿日期 2003-02-17

作者简介 郭琳琅, 1962 年生, 安徽阜阳人, 1991 年毕业于中山医科大学袁硕士袁教授袁副主任医师袁电话 020-61643495 袁 E-mail: linlangg@yahoo.com

苯脱蜡袁酒精透明袁 HE 染色遥

1.1.2 主要试剂及仪器 蛋白酶 K¹CR 反应试剂盒 [包括 dNTP¹CR 缓冲液¹MgCl₂¹aq 酶] 为美国 Promega 公司产品曰聚丙烯酰胺凝胶¹美国 JT Baker 公司冤银染试剂盒¹美国 Bio-Rad 公司冤产品曰 PixCell 200 激光显微细胞分割仪¹美国 Arcturus 公司冤

1.2 方法

1.2.1 激光显微细胞分割仪分割细胞 显微镜下观察切片袁例裸鼠肺部出现小结节性病灶袁标记可疑的结节性病灶袁 ixCell 200 激光显微细胞分割仪下袁选择可疑靶细胞袁激光分割袁转移到 1.5ml 已含有 30 滋 DNA 消化液(蛋白酶 K 0.2mg/ml 袁 mol/L Tris 2.5ml 袁 0.5mol/EDTA 100 滋 袁 50 滋 Tween 20 和 47.15ml 蒸馏水) 的 eppendorf 管内袁 0 益水浴过夜袁 5 益加热变性 10min 袁 20 益保存备用遥

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 对引物遥

首次 PCR P1 为 5'-GGCCTGCTGAAAATGACT
GA-3' 引物 2 为 5'-GCACAGTAATATGCA-TA-3' 遥扩增条件 反应液体积 50 μl 其中 4 μl NTP2 溶液 aq 酶 1.0 U 0.2 μl buffer 2 溶液 引物各 50 pmol/L 遥 95 °C 1 min 焱 5 °C 1 min 焱 2 °C 1 min 焱 0 °C 1 min 焱 0 °C 个循环 焱 2 °C 1 min 延伸 10 min 遥

再次 PCR P1 为 5'-GACTGAATATAAAC-TTG
TGGT-3' 引物 2 为 5'-TGTTGGATCATATTGTC-3' 遥扩增条件 反应液体积同上 焱 5 °C 30 s 焱 5 °C 1 s 焱 2 °C 1 min 焱 0 °C 0 个循环 焱 2 °C 1 min 延伸 10 min 遥

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 漏 0.0% 甲酰胺 0.05% 二甲苯青 0.05% 溴酚兰 混合 已知 AGT 和 TGT 突变的肺癌细胞株及

正常肺组织作为对照 遥 90 °C 变性 5 min 焱 立即置冰浴 遥 聚丙烯酰胺凝胶电泳 电压 200 V 常温下 3 h 遥
1.2.2.3 银染 采用银染试剂盒 遥 10% 乙醇 + 冰乙酸 + FEC 固定 20 min 焱 染色 10~20 min 焱 0% 乙酸终止 固定 10 min 遥 冲水 晾干 封膜 遥

2 结果

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)。图 1 示病灶细胞有一定异型性，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。

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，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 (图 3)。

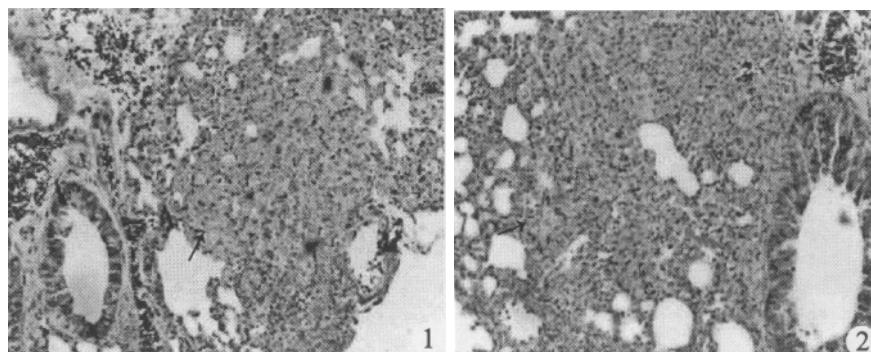


图 1 裸鼠移植瘤模型中肺可疑转移癌细胞灶 (HE, ×100)

Fig.1 Suspected metastatic cancer cell foci in the lung of nude mice with the implanted tumors (HE, ×100)

图 2 裸鼠移植瘤模型中肺良性增生性病灶 (HE, ×100)

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

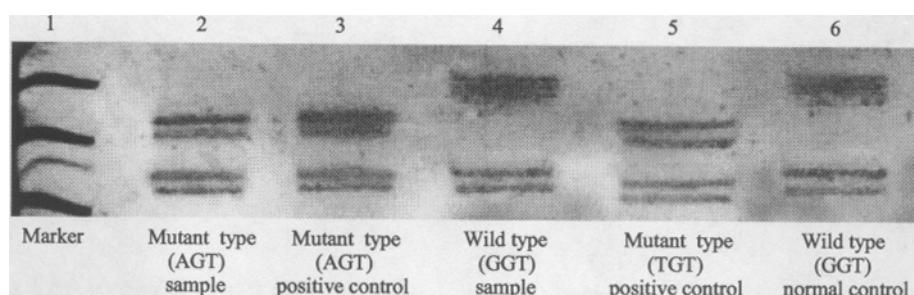


图 3 裸鼠移植瘤模型肺部病灶细胞的单链构象多态性分析

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) 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。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。有关该技术的研究报道较少。

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 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。Ax 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的分子病理学依据。Milchgrub 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

改变袁正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 增强对电泳胶银染显色袁该技术目前已成为基因突变检测 p53 基因和 K-ras 基因和 DNA 多态性的快速筛选和检测的重要手段¹⁻³

Dillon⁴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 基因进行了分析袁认为两技术的结合能快速而有效地完成癌基因的分析遥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袁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袁结果显示可疑转移癌灶细胞存在 K-ras 基因突变袁突变类型为 AGT 袁而良性结节性病灶细胞无 K-ras 基因突变袁为野生型 K-ras 基因⁴

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

参考文献院

袁Emmert-BuckMR, BonnerRF, SmithPD, et al.Laser capturemicrodissection⁵袁Science,1996,274(5289):998-1001.

袁Bonner RF, Emmert-Buck MR, Cole K, et al. Laser capture mi-

crodissection: molecular analysis of tissue⁶袁Science,1997,278(5342):1481-3.

袁ChangMC, ChangYT, WuMS, et al.K-ras mutation at codon 12 in stage I pancreatic adenocarcinoma: analysis by laser capture microdissection and direct sequencing⁷袁Formos Med Assoc,2001,100(5):352-4.

袁LaxSF, KendallIB, TashiroH, et al.The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways⁸袁Cancer,2000,88(4):814-24.

袁MilchgrubS, WistubaII, KimBK, et al. Molecular identification of metastatic cancer to the skin using laser capture microdissection: a case report⁹袁Cancer,2000,88(4):749-54.

袁YamashitaK, TatebayashiT, ShinodaH, et al.Simplified rapid non-radioactive PCR-SSCP method applied to K-ras mutation analysis¹⁰袁Pathol Int,1996,46(10):801-4.

袁Park YK, Park HR, Chi SG, et al. Overexpression of p53 and absent genetic mutation in clear cell chondrosarcoma¹¹袁J Oncol,2001,19(2):353-7.

袁Ortiz BH, AilawadiM, 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 tumors¹²袁Cancer Res,2001,61(19):7264-7.

袁DillonD, ZhengK, CostaJ. Rapid, efficient genotyping of clinical tumor samples by laser capture microdissection/PCR/SSCP¹³袁Exp Mol Pathol,2001,70(3):195-200.

渊上接 724 页冤

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

病变淋巴结内细胞死亡是 KFD 最突出的特征袁本病坏死区中含有核碎片袁凋亡细胞袁组织细胞和少数小淋巴细胞袁所有病例受累区域均可观察到 CD8 渊冤细胞表达遥有学者认为¹⁴袁KFD 病灶中细胞坏死是由于 CD8 渊冤毒性 T 淋巴细胞介导的凋亡所致袁 CD8 渊冤细胞既是靶细胞袁又是效应细胞袁而细胞表达数目的多少与疾病的病程有关袁早期 CD8 渊冤细胞丰富袁晚期则减少遥

本病易误诊为 T 或 B 细胞淋巴瘤袁误诊的原因有¹⁵袁病变区多个病灶相互融合袁淋巴窦消失袁病变区组织细胞欠成熟袁不规则袁局部出现免疫母细胞袁浆样单核细胞袁可见核分裂像遥本病与淋巴瘤的鉴别要点是¹⁶袁KFD 病变区域组织细胞 CD68/MPO 袁淋巴细胞

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

本研究结果提示院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遥

参考文献院

袁MugnainiEN, WatsonT, GuccionJ, et al. Kikuchi disease presenting as a flu-like illness with rash and lymphadenopathy¹⁷袁Am J Med Sci,2003,325(1):34-7.

袁KuoTT. Kikuchi's disease (histiocytic necrotizing lymphadenitis), A clinicopathologic study of 79 cases with analysis of histologic subtypes, immunohistochemistry, and DNA ploidy¹⁸袁Am J Surg Pathol,1995,19(7):798-809.

袁Pileri SA, FacchettiF, AscaniS, et al. Myeloperoxidase expression by histiocytes in Kikuchi's and Kikuchi-like lymphadenopathy¹⁹袁Am J Pathol,2001,159(3):915-24.

袁OhshimaK, ShimazakiK, KumeT, et al. Perforin and Fas pathway of cytotoxic T-cells in histiocytic necrotizing lymphadenitis²⁰袁Histopathology,1998,33(5):471-8.