

RT-PCR法检测肾癌组织中 MN/CA御基因表达

姜耀东¹袁少斌¹袁战会²第一军医大学南方医院¹泌尿外科袁感染内科实验室袁广东 广州 510515 冤

摘要目的 评价 RT-PCR 法检测碳酸酐酶御(MN/CA御)基因在肾癌组织的表达的可靠性遥方法 以 5 例肾癌和 5 例正常肾组织为研究对象袁提取总 RNA 袁两步法进行 RT-PCR 反应袁 MN/CA御的特异性引物扩增袁琼脂糖凝胶电泳后观察并测序遥结果 经过测序证实 5 例肾癌组织的 RT-PCR 产物中有 4 例可见特异的 MN/CA御条带袁而正常肾组织的 RT-PCR 产物均无相应的 MN/CA御条带遥结论 RT-PCR 法检测 MN/CA御在肾癌组织中的表达是准确尧可靠的遥

关键词碳酸酐酶 (MN/CA御)基因表达 肾癌 / 诊断 聚合酶链反应

中图分类号 院 730.53 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588渊004冤1-0099-03

Detection of carbonic anhydrase 御 gene expression in renal cell carcinoma with reverse transcription-PCR

JIANG Yao-dong¹, ZHENG Shao-bin¹, WANG Zhan-hui²

Department of Urology¹, Laboratory of Department of Infectious Diseases², Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To evaluate the reliability of reverse transcription (RT)-PCR in detecting the expression of the carbonic anhydrase 御 (MN/CA御) gene in renal cell carcinoma (RCC). Methods MN/CA御 was examined in 5 cases of renal cell carcinoma tissues and 5 normal renal tissues. Primers specific for MN/CA御 was designed and two-step RT-PCR of the extracted total RNA performed. The products was examined by 2% agrose electrophoresis and identified by sequence nanalysis. Results Specific bands of MN/CA御 were found in RT-PCR products of 4 case of RCC tissues, whereas could not be seen in normal renal tissues. Conclusion RT-PCR is reliable for detecting the expression of MN/CA御 gene in RCC.

Key words: carbonic anhydrase 御 (MN/CA御); gene expression; renal cell carcinoma/diagnosis; polymerase chain reaction

目前对肾癌的早期诊断缺乏有效的手段袁其中的一个重要原因是缺乏特异性的肿瘤标记物遥近年来袁国外的研究^{渊1,2)}发现碳酸酐酶 (MN/CA御)在一些肿瘤中有特异性的表达袁其中也包括肾癌遥MN/CA御被认为是一种肿瘤相关抗原袁其特异性较高袁在肿瘤的诊断尧筛选以及生物治疗方面具有潜在的应用前景遥国内这方面的研究较少遥我们利用 RT-PCR 的方法检测肾癌组织和正常肾组织中 MN/CA御 mRNA 的表达袁并通过序列分析来验证该方法的准确性袁为进一步探讨 MN/CA御基因在肾癌中的表达提供可靠的方法袁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遥

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 扩增仪袁ECKMAN 低温离心机 曰美国 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂袁thermoScript RT-PCR Syst 试剂盒袁德国 QIAGEN 公司 QIAquick 胶回收试剂盒遥ExTaq 酶购于 TaKaRa 公司遥 MN/CA御引物由

上海申友生物工程公司合成遥实验用器械如研钵尧P 管尧IP 枪头均用 DEPC 处理以去除残存的 RNA 酶遥 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袁其中男性 4 例袁女性 1 例遥均经过病理检查证实袁袁其中 3 例为透明细胞癌袁 1 例为颗粒细胞癌遥在肿瘤原发灶上切取 200 mg 左右组织作为癌组织标本袁原发灶远处切取正常肾组织作为对照遥标本切取后立即放入液氮冻存袁防止 RNA 降解遥

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袁参照试剂盒使用说明进行遥产物用核酸定量仪做定量检测遥

1.2.2 逆转录和 PCR 扩增 使用美国 PE 公司 GeneAmp PCR System 9700 扩增仪袁Invitrogen 公司的 ThermoScript RT-PCR Syst 试剂盒进行逆转录遥具体步骤参照试剂盒说明书遥从 GeneBank 中检索出人 MN/CA御基因序列袁设计 MN/CA御引物遥上游引物院 5'-GTCTCGCTTGAAGAAATCG-3'袁下游引物院 A-GAGGGTGTGGAGCTGCTTA-3'遥同时设计内对照甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(GAPDH)基因的引物袁上游引物院 -CTGTTCGATGGAAAAGTCATC-3'袁下游引物院 5'- GCTCGTGCACGTCTAAG ATC- 3'遥 两对引物在

收稿日期 院 003-09-27

作者简介 姜耀东 渊1974- 冤男袁 1997 年毕业于第一军医大学袁现为在读硕士研究生袁袁电话 20-61647097袁 e-mail: jyd@fimmu.com

同一个反应体系中进行 PCR 扩增。反应条件为：94℃ 预变性 1 min；4℃ 变性 25 s；7℃ 退火 30 s；2℃ 延伸 90 s。5 次循环。末次循环后 72℃ 再延伸 5 min。反应完毕后 2% 琼脂糖凝胶电泳。取反应产物 10 μl 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/CA 御特异性引物进行 PCR 扩增。筛选阳性克隆。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 2.043~3.915 ng/μl。其中位浓度为 3.451 ng/μl。A260/A280 为 1.8~2.2。

2.2 PCR 结果

经过 UVP 凝胶成像系统观察 RT-PCR 反应产物。图 1 显示在 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。3 例为阴性。正常肾组织中均为阴性。

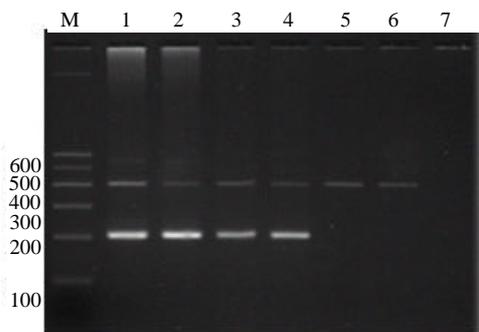


图 1 反转录 PCR 结果
Fig.1 Result of RT-PCR

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/CA 御基因 (基因号 NM_001216) 中的 921~1 120 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。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。年生存率 <10%。平均存活时间不到 2 年。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。

MN/CA 御最早是在人宫颈癌 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。其后发现该蛋白有与碳酸酐酶 A 相似的结构。并被确认为是一种碳酸酐酶的异构酶。命名为 CA 御。MN/CA 御的基因结构和蛋白结构已经基本清楚。MN/CA 御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。MN/CA 御基因位于 9p12-13。根据目前国外的研究。MN/CA 御被认为是一种肿瘤相关抗原。在宫颈癌中有特异性表达。部分学者认为 MN/CA 御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。近来应用免疫组化的方法发现 MN/CA 御在多种肿瘤中有表达。其中也包括肾癌。

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。RT-PCR 阳性结果经过 DNA 序列分析与 MN/CA 御的目的片段吻合。证明该方法的可靠性。因为 MN/CA 御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/CA 御基因的表达。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。目前我们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

Mulders P, Figlin R, de Kernion JB, et al. Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5189-95.
De Kernion JB. Renal tumors. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, et al. *Campbell's Urology* 6th edition. Philadelphia: Elsevier Science, 1993, 1294-342.
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 咱暂第一军医大学学报, 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 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 833-4.
- 咱暂 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 咱暂第一军医大学学报, 2003, 23(9): 954-5.
- Li LB, Luo RC. Clinical significance of serum erythropoietin detection in patients with cancer-related anemia 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 954-5.
- 咱暂 Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens 咱暂 Int J Cancer, 1993, 54(2): 268-74.
- 咱暂 Barnea G, Silvennoinen O, Shaan 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 咱暂 Mol Cell Biol, 1993, 13(3): 1497-506.
- 咱暂 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 咱暂 Oncogene, 1994, 9(10): 2877-88.
- 咱暂 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 咱暂 Genomics, 1996, 33(3): 480-7.
- 咱暂 Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of the MN antigen in cervical Papanicolaou smears is an diagnostic biomarker of cervical dysplasia 咱暂 Cancer Epidemiol Biomark Prev, 1996, 5(7): 549-57.
- 咱0暂 Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes 咱暂 Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(21): 12596-601.
- 咱1暂 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 咱暂 Biochim Biophys Acta, 2000, 1491(1-3): 20-6.
- 咱2暂 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 咱暂 Br J Cancer, 2000, 82(11): 1808-13.
- 咱3暂 Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, et al. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer 咱暂 Br J Cancer, 2002, 86(8): 1276-82.
- 咱4暂 Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, et al. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma 咱暂 J Clin Oncol, 2001, 19(16): 3660-8.
- 咱5暂 McKiernan J, Buttyan R, Bander N, et al. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma 咱暂 Cancer Res, 1997, 57(6): 2362-65.
- 咱6暂 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 咱暂 Cancer, 1999, 86(3): 492-7.

热烈祝贺

我校连续两年产生 973 首席科学家 年度科研经费突破 6000 万

2003 年第一军医大学科研工作再创辉煌

2003 年袁在广大科技人员和各级科研管理人员的共同努力下袁我 校科研工作再创辉煌袁取得了令人瞩目的成绩遥全年共获得纵向立项资助课题 215 项袁经费总额达 6 086.5 万元袁再次刷新了历史记录遥陈武凡教授担任首席科学家的项目遥重要医学信息处理的关键技术研究袁获国家科技部 973 项目立项袁资助经费 2 200 万元袁这是我 校继 2002 年后袁产生的第二位 973 项目首席科学家袁标志着我 校科技综合实力的显著提高遥共有 44 项课题获国家自然科学基金资助袁总额达到 1 047.5 万元袁其中重点项目 2 项遥离子通道功能异常在缺血性脑损伤中的作用及其机理袁和野豚毒症加速 AS 的新机制遥糖化氧化终产物 - 受体活化学说袁袁袁杰出青年基金冶 项遥湘 湘民教授 冤

科技成果评审也是喜讯频传遥在一等奖空缺的情况下袁获得 2 项国家科技进步二等奖遥真皮下血管网皮瓣的开发与拓展应用研究袁和野大肠癌发生与转移的分子调控及早期诊断的研究袁袁袁是医疗卫生组唯一同时获得 2 项二等奖的单位遥在中华医学科技奖评审中袁我 校侯凡凡教授等完成的野慢性肾衰与透析远期并发症的发病机制和临床防治研究袁袁获一等奖遥全国共 6 项冤袁侯金林教授等完成的野乙肝病毒基因组变异的临床和生物学意义袁袁获二等奖遥此外袁还获得 4 项省部级一等奖和 18 项二等奖遥