

· 临床研究 ·

从石蜡包埋肺癌组织提取RNA 检测PML基因转录的研究

赵志龙 宗志红 李建新 刘宏旭 赵惠儒

【摘要】 背景与目的 甲醛固定石蜡包埋组织(FPE)包含大量临床病理信息,同时还含有大量的基因和蛋白质物质可用来研究临床意义。本研究的目的是探讨从FPE中提取RNA的可能性,检测急性早幼粒细胞白血病基因(PML)在肺癌FPE中的转录表达。方法 选取前期经免疫组织化学染色证实无PML蛋白表达的40例肺癌FPE,存档时间在60-85个月,5例新鲜冰冻肺腺癌组织作为对照;利用Trizol一步法提取RNA,经OD值检测验证RNA质量;RT-PCR检测PML的基因转录表达。结果 自肺癌FPE和新鲜冰冻组织提取的RNA的OD比值在1.7-2.1。RT-PCR显示,40例FPE以及5例新鲜冰冻组织中,PML(295 bp)以及 β -actin(318 bp)mRNA均有表达。结论 利用Trizol一步法自FPE提取RNA进行RT-PCR,可有效扩增出300 bp左右的产物;肺癌组织中PML蛋白存在转录后缺失。

【关键词】 RNA提取 石蜡包埋组织 人PML蛋白 RT-PCR 病理学

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.04.010

PML expression in lung carcinomas: analysis by RT-PCR in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

ZHAO Zhilong^{*,#}, ZONG Zhihong^{**}, LI Jianxin[#], LIU Hongxu^{*}, ZHAO Huiru^{*}^{*}Department of Thoracic Surgery, First Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China;^{**}Department of Biochemistry, College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China; [#]Department of Thoracic Surgery, Zhongshan Hospital, Dalian University, Dalian, Liaoning 116001, China

Corresponding author: ZHAO Huiru, E-mail: xuhua1998@163.com

【Abstract】 **Background and objective** Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (FPE) with long term follow-up and clinicopathological data are extensively available and easily accessible. They represent an extensive source of genetic materials and proteins to be investigated for clinical usage. We conducted the study to explore the possibility of extracting RNA from FPE of lung cancer, and checking up the transcription levels of the promyelocytic leukemia gene (PML) by RT-PCR. **Methods** five fresh frozen lung adenocarcinoma tissues and 40 FPEs of lung cancer were chosen; FPEs had been conserved for 60-85 months. All samples had been identified lacking expression of PML protein by immunohistochemical staining. The total RNA was extracted by using Trizol one-step method, and verified by testing OD value. RT-PCR was used to detect the transcription level of PML gene. **Results** The RNAs from both tissues had the OD value ranging from 1.7 to 2.1. RT-PCR results displayed that mRNA of PML (295 bps) and β -actin (318 bps) was not absent in all cancer tissues. **Conclusion** Trizol one-step method is easily accessible, and reliable for extracting RNA in fragments around 300 bases from FPEs. Loss of PML protein in lung cancer is not caused by downward adjustment of mRNA.

【Key words】 RNA extraction Paraffin-embedded tissue Human PML protein RT-PCR Pathology

越来越多的研究证明^[1-4]:自甲醛固定-石蜡包埋组织(Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, FPE)可以提取到RNA,并能用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测基因转录表达,甚至可以进行基因表达定量分析。这个方法的创立及完善对于发现和发展新的诊断方法和治疗

药物具有非常大的实际价值。现已证实基因表达谱与疾病预后相关,研究人员正在寻找可以预测疾病预后或治疗反应的新基因亚群^[5]。而肿瘤分子分期也不断被得到认可和推广。目前,FPE是最广泛的、包含临床预后资料的实体组织样本库,如何充分利用并解读其所包含的宝贵信息尤需重视。

本研究探讨了Trizol一步法自FPE提取RNA的可能性和可靠性;同时,针对PML蛋白无表达的肺癌组织^[6],检测其基因转录水平的情况。

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院胸外科(赵志龙,刘宏旭,赵惠儒);110001 沈阳,中国医科大学基础医学院生物化学教研室(宗志红);116001 大连,大连大学附属中山医院胸外科(赵志龙,李建新)(通讯作者:赵惠儒, E-mail: xuhua1998@163.com)

1 材料

1.1 组织来源 选取1998年1月-2000年6月外科手术切除的肺癌FPE标本40例^[6], 其中小细胞肺癌10例, 非小细胞肺癌30例(腺癌15例, 鳞癌15例), 肺癌组织手术切除后常规经10%中性甲醛固定、石蜡包埋存档。5例手术切除后新鲜冰冻肺腺癌组织作为对照。所有组织前期均经免疫组织化学染色证实无PML蛋白表达^[6], 见图1。入选病例均无术前放疗或化疗。

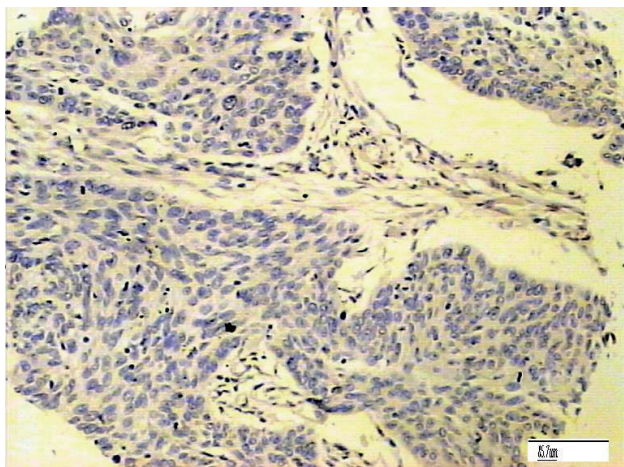


图1 鳞癌, PML在癌细胞和间质细胞均无表达($\times 100$)

Fig 1 Squamous cell cancer, PML expression in neither malignant cells nor mesenchymal cells ($\times 100$)

1.2 试剂和引物 RNA提取试剂: Trizol (Invitrogen 15596-026); RNA-PCR试剂盒 (TakaRa®, ver.3.0); RNA 6000 ladder (Ambion公司)。引物设计: 基因参考序列通过访问美国国立图书馆核酸数据库的共有顺序获得, 引物由大连联星生物公司设计并合成。PML引物295 bps (上游: 5'-TGCTGGAGGCTGTGGACG-3', 下游: 5'-TCTTTCCCCTGGGT- GATGC-3'); β -actin引物318 bps (上游: 5'-ATCATGTTTGAGAC- CTTCAACA-3', 下游: 5'-CATCT CTTGCTCGAAGTCCA-3')。

2 方法

2.1 准备工作 实验所用器皿均经RNA酶灭活处理, 试剂及用水DEPC处理, 不能用DEPC处理的, 应用新开封或者是无RNA酶水。①脱蜡: 修整石蜡块, 充分暴露组织, 切取8 μ m厚切片, 收集100 mg组织, 分别置于1.5 mL离心管中。加入1.2 mL二甲苯混匀, 57 $^{\circ}$ C下脱蜡5 min, 10 000 rpm离心2 min, 去上清, 视石蜡多少重复上述步骤3-5次。②脱

水: 无水乙醇1 mL洗涤两次, 置空气中干燥。

2.2 Trizol一步法提取总RNA 将液氮下研磨后的新鲜冰冻肺癌组织和FPE组织各100 mg置于不同的离心管, 加入1 mL Trizol, 室温下静置5 min。加入氯仿0.2 mL, 震荡15 s后静置3 min, 4 $^{\circ}$ C下10 000 rpm离心15 min。将水相(约占总体积40%-60%)转移至新管中, 加入异丙醇0.5 mL, 混合后室温下静置5 min, 4 $^{\circ}$ C下10 000 rpm离心15 min, 弃上清, 加入75%乙醇1 mL, 清洗RNA沉淀, 4 $^{\circ}$ C下7 500 rpm离心5 min。弃上清, 室温下干燥RNA沉淀(10-15) min。每管加入RNase-free水20 μ L。提取的RNA经OD值测量, 计算 OD_{260}/OD_{280} 比值。

2.3 RT-PCR反应 每管中加入2 μ L MgCl₂, 1 μ L的10 \times RT Buffer, 3.75 μ L的RNase-free水, dNTP Mixture (各10 mM) 1 μ L, RNase抑制剂0.25 μ L, AMV逆转录酶0.5 μ L, Random 9 mers 0.5 μ L, 实验样品RNA (≤ 1 μ g total RNA) 1 μ L, 共计每个样本10 μ L。按以下条件进行反转录, 42 $^{\circ}$ C、30 min, 99 $^{\circ}$ C、5 min, 5 $^{\circ}$ C、5 min, 所得cDNA产物于-20 $^{\circ}$ C保存。

配制PCR反应液: 10 μ L的5 \times PCR Buffer、28.75 μ L灭菌蒸馏水、TaKaRa Ex Taq® HS 0.25 μ L、上游特异性PCR引物0.5 μ L、下游特异性PCR引物0.5 μ L, 共计40 μ L/样本。将反应液加入cDNA中, 轻轻混匀。按以下条件进行PCR反应: PML基因—94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C、40s, 57 $^{\circ}$ C、40s, 72 $^{\circ}$ C、1min一个循环, 共计40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。 β -actin基因—94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C、40秒, 55 $^{\circ}$ C、40 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min一个循环, 共计40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

反应结束后每管内加入Loading Buffer液5 μ L, 增加比重并标记。反应产物经2%琼脂糖凝胶102 V、160 mA下55 min电泳。EB液浸泡4 min, 蒸馏水清洗, 在紫外线下成像。

3 结果

3.1 病人资料提取RNA的检测结果 所采用的FPE肺癌组织保存时间在60-85个月, 平均69个月。新鲜冰冻组织和FPE组织RNA的 OD_{260}/OD_{280} 范围在1.7-2.1。

3.2 RT-PCR结果 PML的长度在295 bps, 而 β -actin的长度为318 bp。在最初的结果中, 在3例FPE组织中, PML及 β -actin没有被扩增出或条带很弱, 随后将这3例组织重新取样提取RNA, 进行RT-PCR, 均获得良好的表达。因此在40例肺癌FPE组织中均获得PML及 β -actin的mRNA表达。与新鲜冰冻肺癌组织相比, FPE组织的PML条带在荧光下亮度稍弱, 也较 β -actin的亮度稍弱, 见图2。

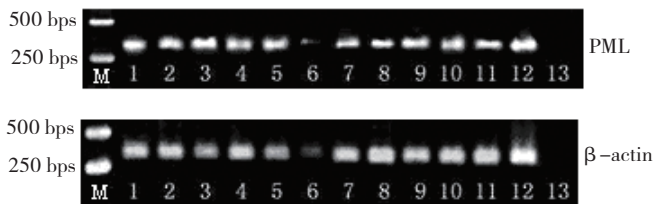


图2 PML的RT-PCR电泳图

Fig 2 Expression of PML examined by RT-PCR

M: Marker; 1-11: FPEs; 12: Fresh tissue; 13: negative control

4 讨论

近来,高通量微阵列技术的发展对大范围基因表达分析提供了强有力的工具^[4]。基于微阵列的肿瘤分类、治疗反应和临床预后预测^[4,7]已经在许多肿瘤开展了;而一些分子标志物更是纳入部分肿瘤的分期中。这些技术通常需要非常多的新鲜冻存组织。目前一些机构正在保存这些冰冻组织,以利于未来进行基因表达分析。与此同时,由于对FPE标本常规收集和储藏,大量具有临床和预后资料的FPE可以方便获得。因此,利用FPE进行基因表达研究、评价预后和治疗反应的关系、建立和评估分子分期将具有巨大实用价值。但是,由于组织固定、长时间保存,不可避免地导致FPE中RNA的降解。此外,甲醛可诱使RNA发生修饰,导致逆转录反应受损;与蛋白质的交联从而导致RNA提取效率减低^[1-4]。所以,与DNA相比,提取RNA的效果不令人满意;也正因为如此,各种技术方法得以不断尝试和涌现。

Rupp和Locker最早成功地在FPE中提取出RNA,并进行northern和dot印记分析^[8]。接下来很多实验室自病毒和人类细胞FPE中提取出RNA。有学者对801例FPE进行RNA提取和PCR扩增,保存40年以上的标本成功率约为40%,而对保存10年的标本成功率大于80%,总的RNA提取和扩增率超过60%^[9]。

在最初的研究中,如果扩增片断大于200 bp,通常不会成功,片断在60 bp-120 bp的RNA扩增率可以接近100%^[10]。最近,Gloghini等^[11]自FPE组织提取的RNA中扩增出长达921 bp的基因。而Bibikova等^[4]不仅从保存长达10年的FPE组织中提取出RNA,并且仅利用50ng RNA就可以进行组织和肿瘤特异性基因表达谱的研究。Byers等^[12]利用市售的FPE组织RNA提取试剂盒从多种人体FPE中提取RNA,进而生成能够用来检测任何基因的cDNA。说明自FPE中提取RNA的技术正趋于成熟。

利用Trizol, Ha等^[13]自病毒FPE中成功提取到RNA,并使用半巢式RT-PCR扩增出目的基因。该研究与大多数文

献报道一样,也使用蛋白酶进行消化。本研究则省略了这个步骤,RNA产量亦很满意,提示蛋白酶消化步骤似不必要,可能与Trizol主要成分-异硫氰酸胍强烈的蛋白变性溶解、破坏细胞结构、抑制RNA酶的作用相关。

起初在室温下脱蜡,重复次数多,脱蜡时间长,脱蜡的效果还不好。随后在57℃恒温水域进行脱蜡,效果明显。PCR扩增循环次数30-35次时,PML和 β -actin经常弱表达,随着PCR扩增循环次数增加到40次后,出现清晰的电泳条带。说明由于甲醛固定,以及在漫长保存过程中RNA酶的破坏,导致RNA破碎,有效的RNA减少所致。因此Trizol一步法提取的RNA不适合进行定量研究,而仅适用于定性分析。

在人类恶性肿瘤组织中,PML蛋白表达常出现明显下调^[7,14-16]。有研究表明:PML基因几乎没有突变或杂合性缺失发生,也与基因转录无关^[15,16]。最近,Scaglioni等^[17]发现:蛋白激酶CK2可对PML蛋白进行磷酸化,从而介导泛素系统对其异常降解,导致PML蛋白的表达下降。

本研究所采用的肺癌标本经免疫组化染色,在癌细胞和间质细胞均没有PML表达,并且在取标本时,我们多集中在癌细胞密集,而间充质细胞少的组织,尽可能避免假阳性的发生。

通过本研究说明,Trizol一步法提取RNA简单可靠,并能扩增出300 bp左右的产物,同时,对比商业化试剂盒要经济许多;PML在肺癌组织中存在转录后表达缺失。

参考文献

- Theophile K, Jonigk D, Kreipe H, et al. Amplification of mRNA from laser-microdissected single or clustered cells in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for application in quantitative real-time PCR. *Diagn Mol Pathol*, 2008, 17(2): 101-106.
- Bibikova M, Yeakley JM, Wang-Rodriguez J, et al. Quantitative expression profiling of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using randomly assembled bead arrays. *Methods Mol Biol*, 2008, 439: 159-177.
- Chen J, Byrne GE Jr, Lossos IS. Optimization of RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded lymphoid tissues. *Diagn Mol Pathol*, 2007, 16(2): 61-72.
- Bibikova M, Talantov D, Chudin E, et al. Quantitative gene expression profiling in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using universal bead arrays. *Am J Pathol*, 2004, 165(5): 1799-1807.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415(6871): 530-536.
- Zhao ZL, Huang QY, Zhao HR, et al. Expression and clinical significance of PML, P53 and P16INK4A in lung cancer. *Chin J Lung*

Cancer, 2007, 10 (3): 176-83. [赵志龙, 黄青远, 赵惠儒, 等. PML、P53和P16INK4A在肺癌的表达以及与临床预后的关系. 中国肺癌杂志, 2007, 10(3): 176-183.]

7 Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 5974-5978.

8 Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, 1988, 6(1): 56-60.

9 Mizuno T, Nagamura H, Iwamoto KS, et al. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol*, 1998, 7(4): 202-208.

10 Lewis F, Maughan NJ, Smith V, et al. Unlocking the archive - gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*, 2001, 195(1): 66-71.

11 Glohini A, Canal B, Klein U, et al. RT-PCR analysis of RNA extracted from Bouin-fixed and paraffin-embedded lymphoid tissues. *J Mol Diagn*, 2004, 6(4): 290-296.

12 Byers R, Roebuck J, Sakhinia E, et al. PolyA PCR amplification of cDNA from RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol*, 2004, 13(3): 144-150.

13 Ha SK, Choi C, Chae C. Development of an optimized protocol for the detection of classical swine fever virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by seminested reverse transcription-polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization. *Res Vet Sci*, 2004, 77(2): 163-169.

14 Marcello G, Leonardo F, Marta F, et al. Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am J Pathol*, 1996, 149(6): 2023-2035.

15 Ping Z, Wai C, Louis TC, et al. Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*, 2000, 85(5): 599-605.

16 Carmela G, Paola C, Rosa B, et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(4): 269-279.

17 Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell*, 2006, 126(2): 269-283.

(收稿: 2008-06-12 修回: 2008-06-25)

(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

部分肺癌临床科研机构网址

- | | |
|---|---|
| 中国抗癌协会
Chinese Anti-cancer Association
http://www.caca.org.cn/ | 美国肿瘤研究协会
American Association for Cancer Research
http://www.aacr.org/ |
| 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会
Chinese Society of Clinical Oncology
http://www.cSCO.org.cn/ | 欧洲医学肿瘤学会
European Society for Medical Oncology
http://www.esmo.org/ |
| 国际抗癌联盟
International Union Against Cancer
http://www.uicc.org/ | 肺癌联盟
Lung Cancer Alliance
http://www.alcase.org/ |
| 美国国立癌症研究院
National Cancer Institute
http://www.cancer.gov/ | 欧洲癌症组织/大会
European Cancer Organisation
http://www.ecco-organ.eu/ |
| 美国癌症学会
American Cancer Society
http://www.cancer.org/ | 肺癌在线
Lung Cancer Online
http://www.lungcanceronline.org/ |
| 美国临床肿瘤学会
American Society of Clinical Oncology
http://www.asco.org/ | 美国国家综合癌症网
National Comprehensive Cancer Network
http://www.nccn.org/ |