维普资讯 http://www.cqvip.com

153-156

克服RT－PCR法检测肿瘤微转移的假阳性

临床学院 胸外科 蒿明建* 李良彬
检验科 张玉洪 王 梅 黄天禄

提 要 为探讨克服RT－PCR法检测恶性肿瘤微转移时出现假阳性的方法，作者运用该法检测了40例非小细胞肺癌和20例食管癌患者病理证实有转移的淋巴结中角蛋白19(CK19)基因的表达。同时还分别运用套式RT－PCR或RT－PCR法检测了10例良性肺和食管肿瘤患者正常淋巴结中CK19基因的表达。结果发现设立分别以未经逆转录的RNA和基因组DNA为模板的对照可观察到是否存在CK19假基因的干扰所造成的假阳性。而在逆转录前用脱氧核糖核酸酶(DNase)消化RNA可消除这种假阳性。运用套式RT－PCR法测定DNase消化后的正常淋巴结RNA可发现CK19基因非法转录所致假阳性，调整方法灵敏度，使之刚好能区分正常和转移淋巴结是解决此类假阳性的合适办法。

关键词 恶性肿瘤；转移；诊断；淋巴结；角蛋白；聚合酶链反应
中图分类号

近年来人们开始运用RT－PCR法来检测恶性肿瘤患者区域性淋巴结、外周血或骨髓中存在的微转移(Micrometastasis)[1]。假基因(Processed Pseudogene)的干扰和组织特异性基因的非法转录(Illegitimate Transcription)是造成RT－PCR诊断癌转移时假阳性的两种主要原因。由于假基因与相应功能基因的转录本间具有高度同源性，易被误认为是扩增到的目的CDNA片段[2]。非法转录是指任何组织特异性基因在异位组织中都存在低水平表达的现象[3]。我们在运用RT－PCR法检测肺癌和食管癌患者转移或正常淋巴结中上皮组织特异性标志物——角蛋白19(CK19)基因的表达时分别观察到了CK19假基因的干扰和CK19基因的非法转录现象，并且对相应的克服措施进行了探讨。

1 材料与方法

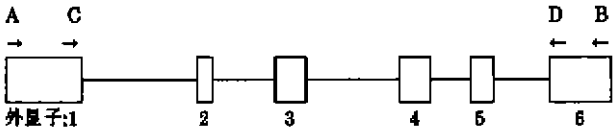
1.1 实验材料

经病理证实的转移性淋巴结分别取自非小细胞肺癌($n=40$)和食管癌($n=20$)患者的纵隔、肺门或食管旁等处。正常淋巴结分别取自可手术的肺结核($n=5$)、肺($n=3$)和食管($n=2$)良性肿瘤患者。每枚淋巴结均一分为二，一半行常规病理检查，另一半留作本实验用。取标本过程中严格防止上皮细胞、癌细胞以及核糖核酸酶(RNase)的污染。

1.2 主要试剂

1.2.1 AMV逆转录酶由Promega公司提供，Taq DNA聚合酶、脱氧核糖核酸酶RQ_1、RNasin、dNTP、PCRMarker等均购自华美生物工程公司。

1.2.2 根据CK19基因全序列[4]设计出以下引物(图1)



引物	序列	定位
A	AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC	628－657
B	TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC	1697－1673
C	TCCCGCGACTACAGCCACTACTACACGACC	757－786
D	CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTCCTAC	1502－1473

图1 CK_{19}基因结构及引物定位和序列。
"——"示内含子，"□"示外显子。引物A和B构成外引物对，扩增大小为1069bp的CDNA片段；引物C和D构成内引物对，扩增745bp的CDNA产物。

CK_{19}内、外引物对及多聚T寡核苷酸$(Oligo(dT)_{16})$引物均合成自北京赛百盛(美国)生物工程公司。

1.3 主要实验仪器

PE－9600型PCR扩增仪(PE公司)、UV－240紫外分光光度仪(日本岛津株式会社)。

1.4 实验方法

1.41. 提取RNA 取约100mg转移或正常淋巴结组织，按"异硫氰酸胍一酚一氯仿提取RNA一步法"[5]提取其中的总RNA，对RNA进行紫外光比色定量。要求吸光度$A_{260}/_{280}$达1.8～2.0范围。

1.4.2 DNase消化RNA标本 每微克核酸中加入0.1U

*男，1970—02出生，住院医师(现为硕士研究生)

维普资讯 http://www.cqvip.com

DNase以消化RNA标本中污染的DNA，将混和物在37°C下孵育30分钟，随后再用酚－氯仿－异戊醇(25:24:1)和氯仿－异戊醇(49:1)抽提纯化标本一次。

1.4.3 逆转录(RT) 将RNA约100ng加入以下逆转录体系中:Oligo(dT)$_{18}$ 25pMlo，dNTP各500μM，Tris—HCl60ml，KCl50mM，$MgCl_2$10mM，AMV－RT 5U，总体积25μl。反应混和物在43°C下，孵育1小时。

1.4.4 一次PCR扩增 将逆转录产物在95°C下变性5分钟、冰浴2分钟后取2μl加至PCR反应体系中，其中包括引物C和D 20pM，dNTP各200μM，Tris—HCL10mM，kcl50mM，$Mgcl_2$1.5mM，Taq DNA聚合酶1U。反应条件为94°C45秒，65°C45秒，72°C60秒，循环40次，最后在72°C下充分延伸5分钟结束反应。

1.4.5 二次PCR扩增或称套式PCR(Nested－PCR) 首轮PCR用引物A和B，其余条件同上，待首轮PCR结束后取1μl产物加入第二轮反应体系中，第二轮反应用内引物C和D，各反应成分及条件与首次PCR扩增相同。

1.4.6 观察结果 取PCR产物5μl在2%琼脂糖凝胶板中电泳，溴化乙锭染色。电泳时间30分钟，电压100伏。在紫外透射反射仪上观察结果。

2 结果

重复实验结果显示，在未用DNase消化时，提取自肺癌(n=40)和食管癌(n=20)患者转移性淋巴结的RNA经RT－PCR或PCR反应均可出现745bp的"CDNA样"阳性产物，而在逆转录前用DNase对RNA标本进行预处理后，经RT和PCR反应者仍有阳性产物出现，而未经RT的RNA经PCR扩增后不再出现阳性信号(图2)。

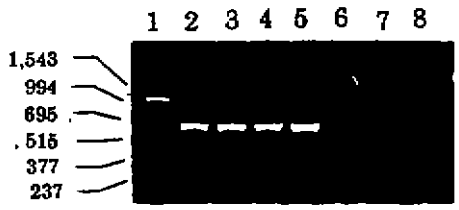


图2 有或无DNase消化标本时转移性淋巴结中CK$_{19}$基因的扩增情况

2，3，4，为无DNase消化时，5，6，7为有DNase消化时，1.分子量标准;2和5为RNA标本经RT和PCR扩增;4和7为基因组DNA标本PCR扩增后;8为空白对照。

为消除CK$_{19}$假基因的干扰，我们对提取自正常淋巴结的RNA或DNA标本均先用DNase消化，然后再进行一次或二次PCR扩增。结果发现在套式PCR时，正常淋巴结中经RT的RNA标本可产生大小为745bp的CDNA片段，但未经RT的RNA或基因组DNA经二次PCR则不出现相同大小的产物。在一次PCR扩增时经RT的RNA、未经RT的RNA或基因组DNA均不出现产物(图3)。

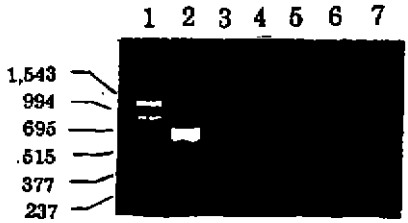


图3 DNase消化后正常淋巴结中CK$_{19}$基因在套式RT－PCR或RT－PCR下的表达情况
2，3，4，为套式PCR扩增，5，6，7为PCR扩增。1.分子量标准件;2.RNA标本经RT+2次PCR反应;3.未经RT的RNA标本经套式PCR扩增;4.基因组DNA经套式PCR扩增;5.RNA标本经RT+1次PCR反应;6.未经RT的RNA标本经1次PCR扩增;7.基因组DNA 1次PCR扩增。

3 讨论

运用RT—PCR法可从基因水平上来诊断存在于肿瘤患者远处部位的微小转移，许多实验结果证实该法较传统方法更优越[1]。然而假阳性是本方法急需解决的问题，其中的原因主要包括假基因的干扰、组织特异性基因在异位组织中的非法转录和PCR产物的污染。后者可通过制定严格的实验操作规程来避免[6]。但目前对由前两种原因造成的假阳性却还没有理想的克服措施。

假基因为相应功能基因转录本的CDNA拷贝插入细胞基因组后形成，在许多哺乳动物的不同基因家族中都发现了假基因的存在[2]。CK$_{19}$假基因与相应的CK$_{19}$功能基因的CDNA序列间的同源性可达82%[4]。我们对经病理检查证实的肺癌和

维普资讯 http://www.cqvip.com

食管癌患者转移淋巴结中未经RT的RNA标本以及基因组DNA进行PCR扩增产生了预期的CK_{19} CDNA拷贝大小相同的DNA产物，说明在我们的实验中假基因的干扰是存在的，这种"CDNA样"产物来源于细胞基因组，用无RNase活性的DNase消化RNA标本中污染的DNA可以消除其中假基因的干扰作用，进一步证明假基因是存在于基因组中的DNA成分。

目前运用RT－PCR法诊断癌转移时主要以CK_{19}等组织特异性基因的表达为检测标志物。然而组织特异性基因非法转录的存在则影响了标志物的特异性。研究表明，在异位组织中可存在极低水平的组织特异性基因的表达[5]，虽然在异位组织细胞中，这种非法转录产生的转录本极少，估计每100～1000个细胞中存在1个mRNA分子[7]，但它却广泛存在。如Buchill[8]运用套式RT－PCR技术扩增到了正常人外周血中CK_8及CK_{19}mRNA。Smith等[9]运用该法检测到多个非前列腺癌细胞株中存在前列腺特异性抗原基因的表达。我们用套式RT－PCR法扩增正常淋巴结RNA标本时得到的CDNA条带应归因于CK_{19}基因在正常淋巴结中的低水平非法转录而不是假基因的干扰，其原因是①在转录前所有标本都被DNase消化过；②未RT的RNA标本和DNA标本扩增后均为阴性；③根据扩增产物的大小可与基因组DNA相区分。

对转移淋巴结，RT－PCR法可准确地检测出CK_{19}基因的表达，但不能检测正常淋巴结中CK_{19}基因的低水平表达。运用套式RT－PCR法则可以检出正常淋巴结中的CK_{19}基因非法转录。可见套式RT－PCR的灵敏度较T－PCR法高。Matsumura等[10]发现套式RT－PCR的灵敏度是RT－PCR法的100倍！因此我们认为调节方法的灵敏度，使之刚能区分正常和转移淋巴结是解决RT－PCR法诊断肿瘤淋巴结微转移时组织特异性基因非法转录的干扰的合适办法。我们认为RT－PCR＋产物电泳法适合于肿瘤淋巴结微转移的检测，原因是该法能准确区分正常和转移淋巴结。在使用此法检测微转移时，我们建议常规设立以基因组DNA和未经RT的RNA为模板的对照以观察实验中是否存在的假基因的干扰。

参考文献

1.Pelkey TJ, Frierson HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. Clin Chem. 1996;42:1369

2.Vanin EF. Processed pseudogene:characteristics and evolution. Ann Rev Genet. 1985;19:253

3.Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, et al. Illegitimate transcription:Transcription of any gene in any cell type. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;86:2617

4.Bader BL, Jahn L, Franke WW. Low level expression of cytokeratin 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. Eur J Cell Biol. 1988;47:300

5.Chomzynski P, Sacchi N. Single－step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate－phenol－chloroform extration. Anal Biochem. 1987;162:156

6.Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature. 1989;339:237

7.Kaplan JC, Kahn A, Chelly J. Illegitimate transcription:Its use in the study of inherited disease. Hum Mutat. 1992;1:257

8.Buchill SA, Bradburg MF, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase－polymerase chain reaction. Br J Cancer, 1995;71;278

9.Smith MR, Biggar S, Hussain M. Prostate－specific antigen messenger RNA is expressde in non－prostate cell:implications for detection of micrometastases. Cancer Res. 1996;55:2640

10.Matsumura M, Niwa Y, Hikiba Y, et al. Sensitive assay for detection of hepatocellular carcinoma associated gene transcription (alpha－fetoprotein mRNA)in blood. BBRC, 1995;207:813

(收稿日期 1997－09－05)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Overcome false－positive in detection of tumor micrometastasis by reverse transcriptase－polymerase chain reaction

Ge Mingjian, et al
Department of Thoracic Surgery, college of clinical medicine

This study aimed to overcome false－positive in detection of tumor micrometastases by reverse transcriptase－polymerase chain reaction (RT－PCR),Using this method, the authors amplified cytokeratin 19(CK19) mRNA in histologically involved regional lymph nodes of 40 patients with non－small－cell－lung－carcinoma and 20 with esophgus cancer. In addition, they amplified CK19 mRNA in DNase－pretreated normal nodes of 10, respectively. They could find out the interference of CK19 pseudogene by performing nontranscribed RNA and genomic DNA controls. This influence could be eliminatde by treating the RNA samples with DNase before complement DNA were synthesized. Using nested RT－PCR method, they could find the presence of illegitimate transcription of CK19 gene in DNase－pretreated normal nodes.It is a suitable measure to remove this false－positive result that regulate the sensitivity of method to distinguish the normal and involved lymph nodes exactly.

KEY WORDS Malignancy; Metastasis; Diagnosis; Lymph node; Keratin; Polymerase chain reaction

156-158

(14)

眼结膜激发试验在鼻变态反应的临床应用

R765.04

临床学院耳鼻喉科 洪苏玲* 黄江菊 陈鸿雁

摘 要 本文对58例鼻变态反应患者行CPT检查，结果显示眼结膜激发试验(CPT)与变应原皮试的结果关系呈正相关。CPT对蜻变应原致鼻变态反应的敏感性为90%，特异性为86.7%，有效性为91.4%。CPT所诱发的症状绝大多数较轻微，仅局限于眼与鼻部。因此本法具安全、准确、简便，易于观察等优点，对诊断吸入性变应原所致之鼻及支气管变态反应性疾病具有实用价值，特别适用于年幼儿童。

关键词 眼结膜激发试验 变态反应
中图分类号 R765

在过去较长时间内，眼结膜激发试验(Conjunctival provocation test, CPT)仅用于诊断眼过敏以及某些药物过敏[9]，晚近国外屡有用于呼吸道变态反应的临床研究[1,8]，但国内有关研究报道极少，虽CPT诊断较为局限，但却简便、安全，易于观察。本文以蜻变应原致鼻变态反应为研究时象，观察CPT在鼻变态反应的临床诊断意义。

1 材料与方法

实验组患者58例，于1993年4月至6月就诊于本院变态反应专科门诊，58例患者均具：(1)既往蜻变应原诱发过敏史。(2)以华西医大提供之蜻变应原行皮内试验呈阳性反应，其阳性程度分类为皮丘>6mm(+)，>8mm(++)，>10mm(+++)>12mm(+++)。(3)应用IRMA法对其行SIgE检测，亦依其结果强度分为4级。(4)58例患者均行CPT检查。CPT操作法以及其阳性判定标准：以溶媒一

* 女，1946－07出生，副教授