

## 地高辛标记的寡核苷酸探针两步原位杂交检测胸液细胞 hTERT mRNA

束军<sup>1</sup>, 孙耕耘<sup>1</sup>, 刘爱平<sup>2</sup>, 刘兢<sup>2</sup> (安徽医科大学第一附属医院呼吸内科, 安徽合肥 230022; <sup>2</sup>中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230026)

**摘要:**目的 建立原位杂交法检测胸液细胞中人端粒酶逆转录酶(hTERT)mRNA的实验方法,初步评价该法识别胸液中肿瘤细胞的效果。方法 取23例胸腔积液病例标本,以地高辛标记的寡核苷酸探针针对胸液细胞hTERT mRNA行两步原位杂交,再通过抗原-抗体-酶-显色途径,测出hTERT mRNA信号。实验研究设严格的阴性、阳性对照,且与临床诊疗各自独立进行。结果 本法对9例恶性胸腔积液病例检测的结果均为阳性,即无论细胞形态是否异常,镜下均可见到有细胞质深染及部分细胞核少许点状着色的细胞。此9例中,7例经胸液细胞形态学检查亦示阳性者,可同时观察到形态明显异常的肿瘤细胞,其余2例经反复胸液细胞形态学检查阴性,但胸膜活检确诊为恶性胸腔积液者,虽未见到形态明显异常细胞,但镜下可发现胞质深染、部分细胞核少许着色的细胞。14例良性胸腔积液病例的检测结果均为阴性。结论 原位杂交法检测胸液细胞hTERT mRNA可望作为一种临床细胞病理学的新方法,用以鉴别胸腔积液的良、恶性,同时判定肿瘤细胞的类型。

**关键词:**原位杂交;人端粒酶逆转录酶;胸腔积液/诊断;细胞病理学

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)07-0771-04

## Detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA of cells in pleural fluid by two-step *in situ* hybridization using digoxin-labeled oligonucleotide probes

SHU Jun<sup>1</sup>, SUN Geng-yun<sup>1</sup>, LIU Ai-ping<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; <sup>2</sup>Academy of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

**Abstract: Objective** To establish a method for detecting human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA of cells in pleural fluid by *in situ* hybridization (ISH), and to evaluate preliminarily the efficacy of this new method in recognizing neoplastic cells in the pleural fluid. **Methods** Fresh pleural fluid specimens were collected in 23 patients with pleural effusions and cell smears were prepared and after pretreatment, ISH between hTERT mRNA of the cells and digoxin-labelled oligonucleotide probes was performed. The signals of hTERT mRNA were detected by the sequential treatment with antigen, antibody, enzyme, and staining. With strict negative and positive controls, the experimental study was performed independent of clinical diagnosis and treatment. **Results** Positive results were seen in 9 cases of malignant pleural effusions, where dark staining of the cytoplasm and a few stained spots in the cell nuclei could be observed microscopically irrespective of the cytomorphological findings. Seven of the 9 cases had positive results of cytomorphological examination, in which neoplastic cell with obvious morphological abnormalities were also spotted. In the other 2 cases where cytomorphological findings were negative but pleural biopsy confirmed the diagnosis of malignant pleural effusions, cytoplasm dark staining with stained spots in the cell nuclei were seen under microscope in spite of the absence of obvious abnormality in cell morphology. In contrast, the 14 cases with benign pleural effusions all had negative results, in which neither staining of the cells was identified microscopically, nor was evidently abnormal cell morphology. **Conclusions** As a new method of clinical cytopathology, detection of hTERT mRNA of cells in the pleural fluid by ISH may provide a new means for cytomorphological examination for differential diagnosis between benign and malignant pleural effusions and for classification of the identified tumor cells.

**Key words:** *in situ* hybridization; human telomerase reverse transcriptase; pleural effusion/diagnosis; cytopathology

胸腔积液是临床十分常见的病症。目前,在临床

收稿日期:2004-03-12

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(2001kj146);安徽省优秀青年科技基金(2002年度第12号)

Supported by Natural Science Foundation of Education Department of Anhui Province (2001kj146); Sci-Tech Research Foundation for Outstanding Young Scientist of Anhui Province

作者简介:束军(1970-)男,主治医师,安徽医科大学在读博士研究生,目前研究方向为胸腔积液的诊断,电话:0551-2902548, E-mail: jun-shu@126.com

上常规运用的诊断恶性胸腔积液的金标准为胸液细胞形态学(cytomorphology)检查,其特异度虽近100%,但灵敏度仅约30%<sup>[1]</sup>,即使在反复胸穿抽液送检的基础上,其灵敏度亦仅约50%,约5.8%被检测病例的胸液细胞学检查结果为恶性可疑<sup>[2]</sup>。对病因不明的胸腔积液,目前临床尚无较好的统一诊断标准<sup>[3]</sup>。

近年来,端粒酶(telomerase)被认为是较理想的一种肿瘤标志物。检测胸液细胞端粒酶活性以鉴别良、恶性胸腔积液,国内外均有过报导,但多为

PCR-ELISA法,假阳性率较高,同时也存在假阴性问题。

原位杂交 (*in situ hybridization*, ISH)法,因不破坏组织细胞形态,可在细胞中特定的位置测出待检分子的信号,从而显示出良好的应用优势。ISH法用于冰冻和石蜡切片等组织细胞中分子的检测,方法已较成熟。但对于游离细胞,尤其是浆膜腔中脱落细胞采用用 ISH 法检测其端粒酶活性,国内外尚无相关报导。本研究在组织切片 ISH 方法基础上,建立了 ISH 法检测胸液细胞中人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) mRNA 的实验方法,报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 标本来源 对 2003 年 4 月至 6 月入住本院的胸腔积液初治患者 23 例行胸腔穿刺抽液术,每例均留取首次胸穿抽取的新鲜胸液标本 100 ml。23 例胸腔积液病例中,良性 14 例、恶性 9 例。以经胸液细胞形态学确诊的胸腔积液病例标本为阳性对照。在本组 23 例实验完成后,将本实验结果与对照组进行比较分析。恶性胸腔积液的诊断依据为具备以下任何一项:①胸液细胞形态学检查发现肿瘤细胞;②胸膜活检病理检查结果提示胸膜原发或继发肿瘤。

### 1.1.2 主要试剂及仪器

1.1.2.1 主要试剂 DEPC 原液;0.01 mol/L PBS(pH7.2);0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH6.0);丙酮;0.1% Triton-X100;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;复合消化液 (蛋白酶 K 2 μg/ml、胃蛋白酶 0.001%、胰蛋白酶 0.025%、EDTA 0.001%、0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液配制);预杂交液 (4×SSC、50%去离子甲酰胺);封闭液 I:(小鼠血清 40%、0.01 mol/L PBS 配制);封闭液 II:[ABB 封闭生物素试剂 (亲和素-生物素-亲和素复合物 2 μg/ml、0.01 mol/L PBS 配制)];杂交液[40%去离子甲酰胺、10%硫酸葡聚糖、1×Denhart 缓冲液、2×SSC、0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2)、50 mmol/L DTT、250 μg/ml 酵母 tRNA、500 μg/ml 变性鲑鱼精、2 μg/ml 地高辛标记寡核苷酸探针]。

其中,杂交液 I 含地高辛标记的寡核苷酸探针 I (其序列为——GGAAG GATGA GTCGA GAGAC TCCGG GTCGG ACTGA——),杂交液 II 含地高辛标记的寡核苷酸探针 II (其序列为——GCAGA GATGG AACTG TCTGG AGGTC GGCAT GTACG——),探针由天津灏洋生物公司提供。

小鼠生物素化抗地高辛抗体;高敏的 SABC 过氧化物酶复合物;DAB 显色剂 (武汉博士德公司提

供)。

1.1.2.2 主要仪器 HVE-110 型高压灭菌锅;LRH-250A 型生化培养箱;蒸馏设备及 CPAMQDSR1 纯水柱 (millipore 公司提供);CS-15R 台式低温离心机 (Beckman 公司);Q/1YS002-94 电热三用水箱;IX70 OLYMPUS 倒置相差显微镜及 BX60 OLYMPUS 正置相差显微镜;OLYMPUS DP50 显微图像计算机系统 (配软件 viewfinder lite 及 studio lite)。

### 1.2 方 法

下述所有操作若无特殊说明,均在低温状态(4℃)下进行,且遵循无菌操作规范,严格按操作 RNA 的要求实验。所有容器、用具实验用前均灭 RNA 酶处理,绝大部分试剂实验中即配即用。缓冲液以 1% DEPC 处理过的去离子水用前配制。除阴性、阳性对照样品,每份胸液标本制细胞涂片 2 张,同时行后续实验。

1.2.1 细胞涂片的制备和冻存 ①取新鲜胸液标本 100 ml,4℃、3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,0.01 mol/L PBS 悬浮沉淀细胞,重复上述步骤再离心两次,弃上清,适量 0.01 mol/L PBS 悬浮沉淀细胞,细胞计数,至细胞悬液中细胞浓度达 10<sup>6</sup>/ml。②取 20 μl 细胞悬液滴于事先准备好的多聚赖氨酸玻片上,水平静置载片。③在细胞悬液周边用免疫组化油笔划圈,后加丙酮、乙醇混合液(体积比为 4:1)60 μl,空气中自然干燥。④将干燥的载片放入切片盒,-70℃冻存,备集中处理。

1.2.2 杂交前处理 ①自-70℃冰箱取出切片后,室温下以 0.01 mol/L PBS(pH7.2)漂洗 10 min,清除细胞表面液体。②滴加 0.1% Triton-X100 80 μl 于细胞区域,增加探针穿透力。0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片 2 次,每次 3 min。③置切片于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中,室温孵育 10 min,灭活内源性过氧化物酶。0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片 3 次,每次 5 min。④滴加复合消化液 40 μl 覆盖细胞区域,室温孵育 30 s,以暴露切片细胞中 mRNA。0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片 3 次,每次 5 min。⑤滴加预杂交液 40 μl 覆盖细胞区域,盖上专用盖片后,37℃湿盒中孵育 3 h。弃盖片后,以 0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片 3 次,每次 5 min,且轻微震荡片刻。⑥滴加 40 μl 封闭液 I 覆盖细胞区域,室温孵育 15 min,以封闭、阻断非特异性 IgG。后倾去封闭液 I,以 0.01 mol/L PBS 室温下清洗切片 1 次,时间 5 min。

1.2.3 杂交 ①滴加杂交液 I 10 μl 覆盖细胞区域,盖上专用盖片后,37℃湿盒中孵育 1 h。②弃盖片后,滴加杂交液 II 10 μl 覆盖细胞区域,盖上专用盖片后,37℃湿盒中孵育 1 h。③弃盖片后,以 0.01 mol/L PBS

室温下冲洗切片3次,每次5 min,且轻微震荡片刻。

1.2.4 杂交后处理 (1)滴加封闭液Ⅱ 40  $\mu$ l 覆盖细胞区域,室温孵育15 min,以封闭、阻断内源性生物素。后以0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片3次,每次5 min。

(2)滴加生物素化抗地高辛抗体 40  $\mu$ l 覆盖细胞区域,37  $^{\circ}$ C湿盒中孵育45 min。后以0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片3次,每次5 min。(3)滴加高敏的SABC 过氧化物酶复合物 40  $\mu$ l 覆盖细胞区域,37  $^{\circ}$ C湿盒中孵育45 min。后以0.01 mol/L PBS 室温下冲洗切片3次,每次5 min。(4)显色:滴加DAB 剂 40  $\mu$ l 覆盖细胞区域,室温避光显色30 min;至较满意显色后,用超纯水清洗,终止反应;80%、90%、无水乙醇及二甲苯依次漂洗,梯度脱水并透明;滴加中性树胶1滴于载片的细胞区域,迅速盖上擦净准备好的玻璃盖片。

1.2.5 实验图像的观察、记录与分析 光学显微镜下观察、摄像并分析。

1.2.6 阴性对照与阳性对照

1.2.6.1 阴性对照 在两步杂交步骤中,均用不含探针的杂交缓冲液或杂交前将样品用RNA 酶A 处理30 min,其余步骤同上,以检验杂交反应的特异性。

1.2.6.2 阳性对照 用通过胸液细胞形态学确诊的恶性胸腔积液且在预实验中检测出 hTERT mRNA 信号的标本作阳性对照,实验步骤同上,以检验杂交反应的灵敏性及实验操作结果与理论预期值相符情况。

## 2 结果

23 例胸腔积液病例中,良性14 例、恶性9 例。

9 例恶性胸腔积液病例的检测结果均为阳性,镜下可见形态异常的肿瘤细胞,其胞质深染,呈棕黄色,细胞核除少许部位有点状着色外,余基本无着色,其它细胞呈半透明状,无着色。

其中,7 例胸液细胞形态学检查示阳性病例者可同时观察到形态明显异常的肿瘤细胞(图1)。余2 例反复胸液细胞形态学检查阴性但据胸膜活检结果确诊为恶性胸腔积液者,虽未见到形态明显异常细胞,但镜下可发现胞质深染、部分细胞核少许着色的细胞(图2)。

14 例良性胸腔积液病例的检测结果均为阴性,即镜下无着色深染的细胞。

## 3 讨论

端粒(telomere)在染色体定位、复制、保护和控制细胞生长寿命等方面具有重要作用,并与细胞凋亡、细胞转化和永生密切相关。

近年研究认为,肿瘤的失控生长不单取决于其过度增生,同时取决于其增生与细胞凋亡之间平衡的改

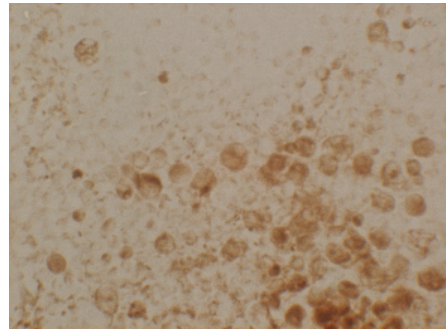


图1 1例经胸液细胞形态学检查示阳性的恶性胸腔积液者 ISH 法检测结果 (DAB 染色,原放大倍数:×400)

**Fig.1 Positive result of *in situ* hybridization in a patient with lung adenocarcinoma, who also positive cytomorphological result**

(DAB staining, original magnification: ×400)

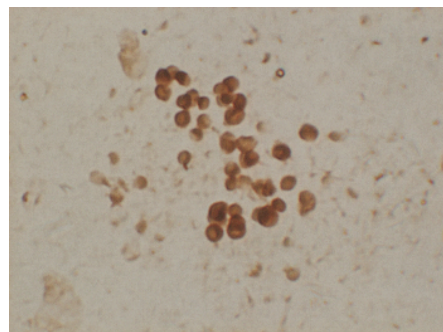


图2 1例经胸液细胞形态学检查示阴性,而胸膜活检结果确诊为恶性胸腔积液者的 ISH 法检测结果 (DAB 染色,原放大倍数:×400)

**Fig.2 Positive result of *in situ* hybridization in a patient with adenocarcinoma, who were negative for cytomorphological examination**

(DAB staining, original magnification: ×400)

变<sup>[4]</sup>。人类肿瘤中,85%~90%的肿瘤细胞存在端粒酶活性的表达,而正常机体细胞中,仅生殖细胞等部分细胞中有表达,但活性都很低<sup>[5,6]</sup>。作为一种特殊的DNA 聚合酶,人端粒酶是由RNA 和蛋白质组成的一种核糖核蛋白复合物(RNP),其基本组成包括模板RNA(template RNA, hTR)和催化蛋白亚单位(catalytic protein subunit),后者即hTERT。现认为hTR 为组成型表达,而hTERT 在端粒酶阴性的细胞中通常缺失<sup>[7]</sup>。在端粒酶活性的表达过程中,hTERT 被认为起着关键性作用<sup>[8,9]</sup>。在多数肿瘤细胞及其它端粒酶活性检测阳性细胞中,端粒酶活性与hTERT 基因表达水平相关<sup>[10-12]</sup>。而在端粒酶阴性的细胞中,无论是转录水平<sup>[8,13]</sup>,还是蛋白质水平<sup>[14]</sup>,均有实验证明未曾检测出hTERT 基因的表达。

近年研究认为,在正常细胞及通过非端粒酶依赖



的端粒延长机制 (alternative mechanism for lengthening of telomere, ALT) 起作用的细胞中,端粒酶被抑制于转录水平,细胞中极少有 hTERT mRNA,而在绝大多数肿瘤组织、永生化细胞中,存在 hTERT mRNA,这些端粒酶阳性细胞的端粒酶活性受 hTR、hTERT mRNA 水平等多因素影响<sup>[7]</sup>。本研究采用原位杂交细胞化学技术,检测胸液细胞 hTERT mRNA,以期据此识别恶性胸液中肿瘤细胞。

本实验采用多相寡核苷酸探针,其主要优点为制备较简单、稳定、使用方便,不需克隆,不会退火,细胞穿透力强,特异性高。地高辛标记,具有操作简便,无同位素污染等优点。实验中分两步杂交,敏感性增强,实验结果更为可靠。较之目前应用较多的免疫细胞化学技术,本实验更能准确地检测 hTERT mRNA 在细胞中的表达与分布。实验中,细胞涂片的制备、原位杂交具体操作及杂交时间等参数,均在参阅相关文献<sup>[5-17]</sup>基础上,通过实践中摸索、改进而设定的。操作中,须在固定时保持细胞的形态完整,反复冲洗步骤中要适度,避免因操作本身所致的假阳性,与此同时,须避免细胞的掉片现象出现。

本实验中,9 例恶性胸腔积液病例检测结果均为阳性,14 例良性胸腔积液检测结果均为阴性,初步显示了本法诊断恶性胸腔积液较理想的灵敏性和特异性。2 例反复行胸液细胞学检查阴性,但据胸膜活检结果确诊为恶性胸腔积液的病例经本法检测结果阳性,不过未见明显细胞形态异常,可能原因有: (1) 肿瘤细胞原本形态不典型; (2) 形态较典型的肿瘤细胞脱落于胸膜腔较久,实验前形态已不典型; (3) 本来形态异常的肿瘤细胞在固定、制片过程中浓缩变形等。无论属何种情况,此皆初步说明用本法诊断恶性胸液细胞的灵敏度可能优于单纯的细胞形态学检查。此外, hTERT 基因可在大多腺癌、少数鳞癌等肿瘤形成的早期阶段 (如组织化生、原位癌) 即出现高表达<sup>[18]</sup>; 若 hTERT mRNA 减少,则肿瘤细胞端粒酶活性即被下调, hTERT 表达水平可作为肿瘤发展程度的标志物<sup>[19]</sup>。

因此,本实验方法尚可望类推于其它游离细胞 (如自支气管肺泡灌洗液、针刺活组织吸取物等获取的细胞),用于肿瘤的早期诊断、疗效判定与预后评估。至于本法对恶性胸腔积液的诊断效能评价,尚有待于进一步大样本量的实验与临床对照研究。虽然本实验对实验条件、操作者的技术水平等均有一定要求,且操作步骤较多,但从本研究结果看,ISH 法检测胸液细胞 hTERT mRNA 可望作为一种临床细胞病理学的新方法,用以鉴别胸腔积液的良、恶性,同时判定肿瘤细胞的类型。

#### 参考文献:

- [1] Braunschweig R, Yan P, Guillet I, *et al.* Detection of malignant effusions: comparison of a telomerase assay and cytologic examination [J]. *Diagn Cytopathol*, 2001, 24(3): 174-80.
- [2] Motherby H, Nadjari B, Friegel P, *et al.* Diagnostic accuracy of effusion cytology [J]. *Diagnostic Cytopathol*, 1999 Jun, 20(6): 350-7.
- [3] Light RW. Pleural effusion [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346 (25): 1971-7.
- [4] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411: 342-8.
- [5] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266: 2011-5.
- [6] Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance [J]. *Clin Chem*, 1997, 43(5): 708-14.
- [7] Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(23): 4818-25.
- [8] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from yeast and humans [J]. *Science*, 1997, 277: 955-9.
- [9] 庞建新, 吴曙光. 端粒酶逆转录酶(hTERT)的分子调节机制 [J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(2): 156-7, 160.
- [10] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al.* Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 232: 97-106.
- [11] Ito H, Kyo S, Kanaya T, *et al.* Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 1603-8.
- [12] Cui W, Aslam S, Fletcher J, *et al.* Stabilization of telomerase length and karyotypic stability are directly correlated with the level of hTERT gene expression in primary fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(41): 38531-9.
- [13] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, *et al.* hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization [J]. *Cell*, 1997, 90: 785-95.
- [14] Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, *et al.* Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues [J]. *Neoplasia*, 2001, 3: 17-26.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学技术 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 220-30.
- [16] 向正华, 刘厚奇. 核酸探针与原位杂交技术 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2001. 102-49.
- [17] Harwood AJ. 盛小禹译. DNA 及 RNA 基本实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 111-21.
- [18] Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(3): 857-64.
- [19] Koyanagi Y, Kobayashi D, Yajima T, *et al.* Telomerase activity is down regulated via decreases in hTERT mRNA but not TEP1 mRNA or hTERC during the differentiation of leukemic cells [J]. *Anti-cancer Res*, 2000, 20: 773-78.