

原位逆转录 PCR 检测干细胞因子 mRNA 在白血病细胞的表达

吴彬袁晓力袁文兰袁冯茹袁尹芳袁周淑芸袁第一军医大学南方医院血液科袁广东广州 510515 冤

摘要目的 探索应用原位逆转录 PCR 渊RT-PCR)检测低拷贝的干细胞因子 mRNA 在白血病细胞表达的可行性遥方法 在普通的 PE480 型 PCR 仪进行原位 RT-PCR 袁检测干细胞因子 mRNA 在 K562 尧HL-60 和慢性粒细胞性白血病细胞的表达遥结果 直接法和间接法原位 RT-PCR 均可以检测到干细胞因子 mRNA 在 K562 尧HL-60 和慢性粒细胞性白血病细胞表达袁而常规的原位杂交则为阴性遥结论 渊渊渊)细胞因子在 K562 尧HL-60 和慢性粒细胞性白血病细胞均有表达袁但是表达量较低袁应用原位 RT-PCR 可进行检测渊渊渊)在普通的 PE480 型 PCR 仪上进行原位 PCR 遥

关键词聚合酶链反应 原位杂交 K562 细胞 HL-60 细胞 白血病 干细胞因子 mRNA 袁使
中图分类号 342.24;R733.72 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)06-0490-03

Detection of stem cell factor mRNA expression in leukemic cells by in situ reverse transcriptase-PCR

WU Bin,LIUXiao-li,XUANWen-lan,FENGRu,YINFang,ZHOUSHu-yun

Department of Hematology,NanfangHospital,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of detecting low copy stem cell factor (SCF) mRNA in leukemic cells by in situ reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Methods In situ RT-PCR was carried out on PE480 DNA Thermal Cycler to determine the expression of SCF mRNA in K562, HL-60 and chronic myelogenous leukemia (CML) cells in blast phase. Results SCF mRNA was detected in the 3 cell lines by direct or indirect in situ RT-PCR, but not by in situ hybridization. Conclusion SCF mRNA is present in K562, HL-60 and CML cells in blast phase but with very low expression level which can be detected by in situ RT-PCR carried out on PE480 DNA Thermal Cycler.

Key words: polymerase chain reaction; in situ hybridization; K562 cells; HL-60 cells; leukemia; stem cell factor; RNA, messenger

干细胞因子渊stem cell factor 袁SCF)是一种早期阶段的多系造血刺激因子袁对正常造血调控具有重要作用遥SCF 来源非常广泛袁在人类除骨髓基质细胞外袁皮肤尧胎盘组织和部分起源于造血组织的癌细胞系都有表达遥有文献报道骨髓基质细胞是 SCF 的主要来源袁但其 mRNA 拷贝数仅为 9 依 10⁵ 袁推测其他细胞的表达量会更低袁所以一般方法难以检测遥逆转录 PCR 渊RT-PCR)技术可检测低拷贝或单拷贝的 mRNA 袁但不能体现细胞的形态结构特征遥原位 PCR 技术不仅可以检测组织切片或完整细胞中的单个拷贝 DNA 或 RNA 袁还能判断含有靶序列的细胞类型及其形态结构袁结合图象分析袁可以对靶序列进行定量分析遥本研究旨在探索应用原位 RT-PCR 检测低拷贝的 SCF mRNA 在白血病细胞表达的可行性遥

人红白血病细胞株 K562 尧人幼粒白血病细胞株 HL-60 和小鼠成纤维细胞株 NIH3T3 按常规方法培养遥取肝素抗凝的骨髓 2~3 ml 袁密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞遥

1.2 细胞离心涂片

收集培养 2~3 d 的 K562 尧HL-60 和 NIH3T3 细胞各渊~2 冤伊 10⁵ 袁BS 洗涤 3 次袁000 r/min 离心 5 min 袁涂片袁% 多聚甲醛固定 20 min 袁0 尧/ml 蛋白酶 K 消化 10~15 min 遥取分离后的骨髓单个核细胞渊~2 冤伊 10⁵ 离心涂片袁其余步骤同上遥

1.3 寡核苷酸引物及探针

参考文献渊渊渊)由上海生工生物工程公司合成遥碱基序列如下袁|物 A 渊'-AATGCGTGGACTATCTGCG-3' 尧|物 B 渊'-CCTGGGTTCTGGGCTCTTGA-3' 遥寡核苷酸探针 渊'-GGCAAACATCCATCCCCG-3' 遥寡核苷酸加尾标记及检测试剂盒购自 Gibco BRL 公司袁操作按说明书进行遥

1.4 原位杂交

详细步骤参见文献渊渊渊)

1.5 RT-PCR

逆转录反应根据参考文献渊渊渊)进行遥将 20 滋 总反应液置于原位 PCR 模具中并密封袁7 益 孵育 90 min 袁

1 材料与方 法

1.1 细胞培养及骨髓单个核细胞的分离

收稿日期 001-11-23

基金项目 国家自然科学基金 (39770831) 尧广东省自然科学基金 (970833)

作者简介 袁彬 渊963-冤男 袁辽宁大连人 袁第一军医大学在读博士研究生 袁主治医师 袁电话 20-85141617, E-mail: wubin63@yahoo.com.cn

逆转录结束后去掉原位 PCR 模具,BS 洗涤 2min,依次晾干后进行 PCR 反应,将液体石蜡油加满 PE480 型 PCR 仪,美国 PE 公司,的 48 个孔并用铝箔平盖于其上,载玻片平放于铝箔之上,PCR 反应体系: Taq DNA 聚合酶 3 U, 0 pmol/ 上下游引物各 3 滋, mmol/LdNTP5 滋, 间接法: mmol/LdNTP4 滋, 直接法: 0 滋, mol/LDig-dUTP5 滋, 直接法: 加水至总反应体积为 50 滋, 将 50 滋 总反应液加入原位 PCR 模具内并密封, PCR 程序: 4 益变性 65 s, 7 益退火 70 s, 2 益延伸 100 s, 共 29 个循环, 第 30 个循环 72 益延伸 10min, 间接法在 PCR 完成后 95 益变性 8min, 将载玻片置于 -20 益预冷的无水乙醇中 10min, 同时设置阴性对照, 阳性对照, 空白对照, 探针对照。

1.6 原位 RT-PCR 的杂交及检测

1.6.1 直接法 去掉原位 PCR 模具, PBS 洗涤 2min, 依次 3 次, 缓冲液玉 渊, 1mol/L 顺丁烯二酸, 15mol/L NaCl, 7.5 渊, 洗涤 1 min, 依次 缓冲液域 渊, 试剂盒提供的 10% 阻断剂, 缓冲液玉 =1 渊, 孵育 30min, 载地高辛抗体 渊, 00 渊, 孵育 60min, 缓冲液 洗涤 10min, 依次 缓冲液芋 渊, 00 mmol/L Tris, HCl, 渊, 00 mmol/L NaCl, 渊, 0mmol/L MgCl₂, 渊, H9.5 渊, 洗涤 2min, 依次 印显色液 100 滋, 渊, BT/BCIP4 滋, 缓冲液芋 96 滋, 显色 2h, 缓冲液玉 洗涤 5 min, 依次 缓冲液郁 渊, 0 mmol/L Tris, HCl, 渊, mmol/L EDTA, 渊, H8.0 渊, 洗涤 2min, 依次 终止显色, 亲水性树脂封片, 镜下观察并拍照。

1.6.2 间接法 变性后去掉载玻片上的原位 PCR 模具, PBS 洗涤 2min, 依次 预杂交 37 益, 孵育 5 h, 2 益, 杂交过夜, 渊, 6 渊, SC/45% 甲酰胺, 洗涤 10min, 依次 渊, SSC37 益, 洗涤 10min, 依次 渊, 2 渊, SSC37 益, 洗涤 10min, 依次 渊, 其余步骤同直接法。

2 结果

2.1 原位杂交

K562 渊, IL-60 渊, NIH3T3 及慢性粒细胞性白血病患者的单个核细胞的原位杂交均为阴性。

2.2 直接法原位 RT-PCR

用直接法原位 RT-PCR 分别对 K562 渊, IL-60 和慢性粒细胞性白血病患者骨髓单个核细胞表达 SCF 进行了检测, 结果上述 3 种细胞均呈阳性, 而作为阴性对照的 NIH3T3 细胞和设置的空白对照均为阴性, 细胞膜完整, 部分细胞膜呈瘤状突起, 较大, 细胞核约占 4/5 以上, 核仁不清楚, 阳性产物较均匀地分布在胞质内, 背景不甚理想, 有许多散在阳性细颗粒分布于无细胞结构区域。

2.3 间接法原位 RT-PCR

K562 细胞 渊, IL-60 细胞和慢性粒细胞性白血病

患者的外周血细胞均呈阳性, 设置的对照为阴性, 阳性产物几乎全部局限在胞质内, 背景上偶有几个细颗粒。

3 讨论

原位 PCR 技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一种相当敏感的基因诊断技术, 自 1990 年 Haase 等^[1]首先报道后, 已应用于病毒感染, 基因突变, 染色体易位和基因低水平表达等方面的研究^[2-4]。原位杂交是分子杂交与组织化学技术的成功结合, 在显示阳性杂交信号的同时, 还能判别含有靶序列的细胞类型以及组织细胞的形态结构特征与病理变化^[5]。但有时候原位杂交的应用受到其敏感性限制, 细胞内单拷贝 DNA 序列和低于 10~20 拷贝的 RNA 序列, 往往不能被原位杂交检出^[6]。原位 PCR 反应在由细胞膜组成的囊袋内进行, 既能检出细胞内单拷贝或低拷贝的 DNA 或 RNA 序列, 同时还可对含靶序列的组织细胞进行形态学分析。原位 PCR 通常分为直接法和间接法两种, 前者是使扩增产物直接携带标记分子, 后者则是用带有标记分子的探针与组织细胞内 PCR 扩增产物杂交。

我们首先用地高辛加尾标记的寡核苷酸探针对 K562 渊, IL-60 和慢性粒细胞性白血病患者的骨髓单个核细胞进行了原位杂交, 结果均为阴性, 说明由于被检测的 mRNA 拷贝数低, 原位杂交不能检测出 K562 和 HL-60 细胞内 SCF mRNA 序列。在原位杂交阴性的情况下, 为证实这两种细胞株及慢性粒细胞性白血病患者的白血病细胞确有 SCF mRNA 的表达, 我们进行了原位 RT-PCR 检测。直接法原位 RT-PCR 结果显示, K562 渊, IL-60 和慢性粒细胞性白血病患者骨髓白血病细胞均呈强阳性。K562 和 HL-60 细胞质内有多个空泡, 部分细胞膜呈瘤状突起, 深蓝色阳性颗粒较均匀地分布在细胞浆内, 细胞外有较多弥散的细颗粒。考虑一是退化细胞膜通透性增加, mRNA 外漏, PCR 扩增在细胞外进行, 二是地高辛标记的 dUTP 与玻片上的多聚赖氨酸粘附, 冲洗不充分, 显色后出现细颗粒。直接法原位 RT-PCR 虽然过程比较简单, 容易掌握, 所需时间短, 影响因素相对少, 但缺点是特异性较差, 背景高, 容易出现假阳性, 因此设置严格的对照意义重大, 可以最大程度减少假阳性。在我们的实验中设置了多种对照, 更重要的是我们随后的间接法原位 RT-PCR 与直接法结果相同, 这基本上排除了假阳性的可能。间接法原位 RT-PCR 结果更清晰, 背景低, 特异性强, 更适合进行图象分析, 其缺点是需要事先标记探针, PCR 完成后需进行预杂交, 杂交过夜, 随后进行多次洗脱, 过程繁琐。以往的原位 PCR 要求在专用的原位 PCR 仪上

进行我们在普通的 PE480 型 PCR 仪平台上铺一张铝箔将载玻片置于铝箔之上进行原位 PCR 也取得了满意的效果一方面节省资金另一方面更容易使原位 PCR 技术得到普及推广

参考文献

- Linenger ML, Jacobson FW, Bennett LG, et al. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. *Exp Hematol*, 1995, 23(10):1104-14.
- Pietsch T, Kyas U, Steffens U, et al. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood*, 1992, 80(5):1199-206.
- 柳柏林, 李彬, 靳卫东, 等. 人及小鼠干细胞因子的 cDNA 克隆及其序列分析. *中华血液学杂志*, 1995, 16(6):283-7.
- Liu BL, Li B, Jin WD, et al. cDNA cloning and sequencing of human and mouse stem cell factor. *Chin J Haematol*, 1995, 16(6):283-7.
- 苏慧慈. 原位杂交. *北京: 中国科学技术出版社*, 1994. 59-72.
- 郑维扬, 周淑芸, 王小琪, 等. 巢式 PCR 检测白血病微量残留

- bcr/abl mRNA. *中华血液学杂志*, 1994, 15(5):227-9.
- Zheng WY, Zhou SY, Wang XQ, et al. Detection of leukemia residual bcr/abl mRNA with nested polymerase chain reaction. *Chin J Haematol*, 1994, 15(5):227-9.
- Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *J. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(13):4971-5.
- Liu X, Giambone JJ, Hoerr EJ. In situ hybridization, immunohistochemistry, and in situ reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 2000, 44(1):161-9.
- Athanasios E, Kotoula V, Hytiroglou P, et al. In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction for cyclin D1 mRNA in the diagnosis of mantle cell lymphoma in paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol*, 2001, 14(2):62-71.
- Koltai H, Bird DM. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections. *Plant Physiol*, 2000, 123(4):1203-12.
- 苏慧慈. 原位 PCR. *北京: 中国科学技术出版社*, 1995. 94-118.

胫骨粗隆和髌韧带浸润性痛风结节 1 例报告

Invasive tophus in the tibial tuberosity and patellar ligament: report of one case

徐波, 袁耀旋, 第一军医大学南方医院骨科, 广东广州 510515

关键词: 痛风, 痛风结节, 胫骨粗隆, 髌韧带

中图分类号: R589.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)06-0492-01

1 临床资料

患者男, 8 岁, 因左膝下肿块近 20 年, 反复疼痛 5 年, 于 2001 年 10 月 9 日入院。开始发现时左膝下肿块只有小指甲大小, 无不适感觉, 1 年前开始在左膝活动较多后感觉疼痛, 近 2 年来可见肿块逐渐增大, 疼痛程度加重, 并常伴有局部肿胀。入院检查: 左膝髌韧带上可见一 2.5 cm × 1.0 cm 大小的肿块, 局部无红肿, 皮温不高, 质地柔软, 边界不清, 基底位于髌韧带下方, 有轻度压痛。左膝屈曲 130° 时, 右膝小 20°。X 线显示: 左胫骨粗隆内有部分破坏, 向关节方向有一高密度增生病变, 约 0.6 cm × 1.0 cm。放射诊断为: 骨软骨瘤。B 超见左膝局部皮下 2.2 cm × 1.7 cm 中强光团, 边界尚清。实验室检查: 尿酸 692.7 mmol/L。术前准备后, 在持续硬膜外麻醉下行左膝下肿块切除术。术中见: 肿块顶部于皮下, 部分有透明包膜, 内为石灰样物质。肿块在髌韧带正中穿出, 尿酸盐广泛侵入整个髌韧带中, 基底底部则侵入胫骨粗隆深部, 近 1.5 cm, 形成长宽深为 2.0 cm × 1.5 cm × 1.5 cm。破坏区用刮匙共刮出石灰样物质约

10 ml。为避免髌韧带在胫骨粗隆附丽处稳定性被破坏, 尽量保存上方骨质, 最后再用 1500 ml 温生理盐水反复冲洗, 将髌韧带缝合。复查病理报告为: 痛风结节。术后抗痛风治疗, 并长腿石膏托外固定保护 3 周, 未出现发热、局部肿痛等痛风急性发作症状, 术后行走基本正常。

2 讨论

痛风是嘌呤代谢障碍所致全身性疾病, 常导致第一跖趾关节为主的小关节损害, 受累关节和周围出现红肿热痛等症状, 转入慢性期后也常伴有近关节附近肌腱、腱鞘或皮下形成痛风结节。多数痛风结节在韧带或关节表面由尿酸盐结晶沉积而成, 少有浸润大韧带的报道。如果痛风结节最初在髌韧带下滑膜囊形成, 是由于膝关节运动造成的强大压力长期作用于此, 可能是造成痛风结节向上浸润突破髌韧带至皮下, 向下沿髌韧带浸润入胫骨粗隆的主要原因。本例患者由于从急性痛风性关节炎状态加之 X 线显示为伴有基底部胫骨粗隆破坏的长条状高密度影, 类似于骨软骨瘤样的 X 线表现特征, 术前确诊痛风结节大且影响骨关节功能者, 宜手术治疗。

收稿日期: 2001-10-15

作者简介: 徐波, 男, 1966 年, 湖南怀化人, 1995 年毕业于第一军医大学, 主治医师, 副主任医师, 电话: 20-85142265