

文章编号:1005-6947(2005)03-0183-03

· 实验研究 ·

TRAP-Sybr Green I 法检测结直肠癌端粒酶活性

樊冰, 江涛, 罗建新, 彭剑雄

(中南大学医学技术与情报学院 医学检验系临床生化教研室, 湖南 长沙 410013)

摘要: **目的** 应用新型核酸荧光染料 Sybr-Green I 检测端粒酶活性, 并探讨该酶活性在结直肠癌临床诊断中的意义。 **方法** 用端粒重复扩增 (TRAP) 结合 Sybr-Green I 技术检测 46 例结直肠癌及 19 例癌旁组织中端粒酶的活性。 **结果** Sybr-Green I 能清晰显示端粒酶扩增后的条带。端粒酶活性在结直肠癌中阳性率为 89.13%, 在癌旁组织中未发现端粒酶活性。端粒酶活性与细胞分化程度、Dukes 分期、有无淋巴结转移均无关。 **结论** 用 Sybr-Green I 检测端粒酶活性对于诊断结直肠癌具有重要的临床辅助价值。

关键词: 结直肠肿瘤/诊断; 端粒酶; 核酸荧光染料

中图分类号: R735.35; R446.5 **文献标识码:** A

Detection of telomerase activity in tissues of colorectal carcinoma with TRAP-Sybr Green I

FAN Bing, JIANG Tao, LUO Jian-xin, PENG Jian-xiong

(Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Laboratory Medicine, College of Medical Technology and Information, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To apply a fluorescent nucleotide dye Sybr Green I in detecting telomerase activity and assess its clinical value in the diagnosis of colorectal carcinoma. **Methods** Telomerase activity was measured by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) combined with fluorescent nucleotide dye Sybr Green I in 46 cases of colorectal carcinoma tissue specimens and 19 tumor-adjacent tissue specimens. **Results** Telomeric repeat amplification product was displayed as clear bands in PAGE stained with Sybr Green I; the positive rate of telomerase activity in colorectal carcinoma tissue was 89.13%, whereas no telomerase activity was observed in 19 tumor-adjacent tissue specimens. There was no relationship between telomerase activity and the level of cell differentiation, Dukes stages, or metastasis of lymph nodes. **Conclusions** The method of TRAP combined with Sybr Green I to determine telomerase activity is an important method for the diagnosis of colorectal carcinoma.

Key words: COLORECTAL NEOPLASMS/diag; TELOMERASE; FLUORESCENT NUCLEOTIDE DYE

CLC number: R735.35; R446.5 **Document code:** A

端粒 (telomere) 是位于真核生物染色体末端的一种特殊结构, 由端粒 DNA 和端粒蛋白质组成^[1]。端粒酶本身是一种逆转录酶, 它以自身 RNA 为模板, 逆转录合成端粒 DNA, 可以避免因 DNA 复制时

端粒缩短所致的细胞衰亡, 使细胞获得无限增殖的能力。大多数恶性肿瘤中可检测到端粒酶的活性, 而正常体细胞不表达或微弱表达端粒酶活性, 端粒酶激活是肿瘤形成的重要机制之一^[2]。为了进一步探讨端粒酶在恶性肿瘤中的表达, 本实验在 Kim^[3] 等报道的端粒重复扩增法 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 基础上结合应用新型荧光染料 Sybr-Green I (S-G I) 染色法对结直肠癌端粒酶活性进行测定分析, 探讨 TRAP-S-G I 法在临床

收稿日期:2004-11-11; 修订日期:2005-02-01。

作者简介:樊冰 (1978-), 女, 河北邢台人, 中南大学湘雅医学院硕士研究生, 主要从事 RNA 干扰及其对端粒酶活性特异性抑制方面的研究。

通讯作者:彭剑雄 13687315058 (手机); E-mail: jxpeng@xysm.net。

肿瘤诊断中的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本来源 46例结直肠癌组织和19例癌旁正常黏膜组织(距离肿瘤组织15cm以外)为湘雅医院2004年4月~2004年7月手术切除标本,经病理检查鉴定。46例临床标本中男26例,女20例,年龄29岁~75岁,平均52岁。

1.1.2 主要试剂和仪器 引物:TS 5'-AATC-CGTCGAGCAGAGTT-3'; CX 5'-CCCTTACCCTTACCCT-TACCCTAA-3'(长沙虹宇科技有限公司)。另备10000×S-G I(上海开放科技有限公司),Marker:pBR322/Hae III(上海生工生物有限公司),Thermol Hybaid Px2热循环仪(英国Thermol Hybaid公司),DYY-III型垂直电泳槽(北京六一仪器厂)及DYY-III5型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 方 法

1.2.1 待测样本的处理 取新鲜组织称重,用冰冷的0.1mmol/LPBS清洗2次后,用HEPES液(10mmol/L HEPES, 1.0mmol/L DTT, 1.0mmol/L MgCl₂, 10mmol/L KCl)清洗1次,放入玻璃匀浆器中,在冰浴中匀浆10min,按4μL/mg组织加入冰冷的裂解液(10mmol/L Tris-HCl, 1.0mmol/L LMgCl₂, 1.0mmol/L EDTA, 0.1mmol/L PMSF, 5.0mmol/L BME),继续匀浆10min,再冰浴30min,在4℃条件下,12000r/min离心30min,取上清。酚试剂法测定蛋白浓度,用1×TRAP buffer稀释成最适宜蛋白浓度为0.3g/L的待测样品。

1.2.2 端粒重复序列扩增^[3] 反应体系为30μL,含有10×TRAP buffer(200mmol/L Tris-HCl, 0.05V/V Tween-20, 630mmol/L KCl, 1mg/mL BSA, 1mmol/L EGSA) 3μL, 0.5mmol/L dNTP 3μL, 10μmol/L TS引物1.5μL, 15mmol/L MgCl₂ 3μL, 标本4μL, 石蜡油25mL, 12000r/min, 离心5s, 25℃ 30min, 95℃ 3min, 再加入5U/μL Taq DNA聚合酶0.4μL, 10μmol/L CX引物1.5μL, 以94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 90s进行30个循环,最后72℃保温5min。阴性对照:待测样品用Rnase A核酶于37℃处理30min,阳性对照:为Hela细胞。

1.2.3 电泳分析 取15μL PCR产物加入5μL载样缓冲液和100×S-G I染料2μL,混匀,避光放置10min,于12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,取出凝胶直接在紫外透射仪上观察区带并照像。

2 结 果

2.1 TRAP-S-G I法检测端粒酶活性

TRAP产物PAGE电泳后,经S-G I染色显示出的清晰的梯状条带(附图)。

1:阴性对照;2~5:阳性组织;6:阳性对照;7:阴性组织;8:Marker

附图 结直肠癌组织中端粒酶活性检测结果

2.2 结直肠癌及癌旁组织端粒酶活性阳性率

46例结直肠癌组织中,检测出端粒酶活性41例,阳性率89.13%;19例癌旁正常黏膜组织中,未见端粒酶活性阳性者。

2.3 端粒酶活性与临床资料的联系

根据结直肠癌的细胞分化程度、Dukes分期、有无淋巴转移进行分组,各组端粒酶活性阳性率的比较无显著性差异(均 $P > 0.05$)(附表)。

附表 端粒酶活性表达

临床资料		<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
细胞分化	高分化	21	19	90.48
	中分化	19	17	89.47
	低分化	6	5	83.33
分期	A	9	8	88.89
	B	15	13	86.67
	C	15	14	93.33
	D	7	6	85.71
淋巴结转移	有	25	22	88.00
	无	21	19	90.48

3 讨论

TRAP法是Kim等人^[3]率先建立的端粒酶活性检测方法。该法的产物分析应用同位素法,方法烦琐,检测时间长,而且存在同位素污染的危险。本实验利用一种新型的核酸染料S-G I,这种染料是一种非对称花菁类化合物,与核酸有极高的亲和力,对核酸测定具有较银染法更高的灵敏度。Gottlieb等^[4]报道用改良的银染法检测双链DNA灵敏度为5ng,而S-G I染色法检测双链DNA灵敏度可达0.5ng^[5]。利用其对核酸测定的高灵敏度可进一步提高TRAP法检测的能力。此外S-G I染色法还具操作简便,使用安全,价格便宜等优点^[5],更适合临床广泛应用。

结直肠癌是严重威胁人类生命的恶性肿瘤之一,目前除早期诊断手术切除外,无其他更好的治疗手段,所以,结直肠癌的早期诊断有其重要意义。本实验对46例结直肠癌组织中,检测出端粒酶活性41例,阳性率89.13%;19例癌旁正常黏膜组织中,未见端粒酶活性阳性者,与国外文献报道一致^[6,7],提示端粒酶活化可能为结直肠癌细胞无限增殖所需,端粒酶有望成为结直肠癌诊断的标志物。端粒酶活性肿瘤临床病理因素的联系也在一些肿瘤中如乳腺癌^[8]甲状腺癌^[9]被发现,结直肠癌端粒酶活性与肿瘤的细胞分化程度、Dukes分期、有无淋巴转移无直接关系($P > 0.05$),这表明,端粒酶的激活可能在结肠癌的早期就发挥着生物学活性,所以,能破坏端粒酶激活的过程或破坏其激

活的生物环境,就有可能抑制癌症的发生。总之,端粒酶活性普遍存在于结直肠癌组织中,可作为结直肠癌的基因标志物。检测结直肠癌组织中端粒酶活性对于结直肠癌的早期诊断、早期治疗有一定的意义。

参考文献:

- [1] Blackburn EH. Structure and function of telomeres [J]. Nature, 1991, 350(6319): 369-373.
- [2] Blasco MA. Mammalian telomeres and telomerase: Why they matter for cancer and aging [J]. Eur J Cell Biol, 2003, 82(9): 441-446.
- [3] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [4] Gottlieb M, Chavko M. Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gel [J]. Anal Biochem, 1987, 165(1): 33-37.
- [5] Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, et al. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system [J]. Anal Biochem, 1999, 276(1): 59-64.
- [6] Lukman K, Maskoen AM, Achmad TH, et al. Telomerase activity in different clinical staging of colorectal adenocarcinoma [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2000, 27(2): 491-497.
- [7] Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer [J]. J Clin Pathol, 1997, 50(2): 106-109.
- [8] 黄建华, 吕新生, 刘少华. 端粒酶活性在乳腺癌中的表达及临床病理学相关性研究 [J]. 中国普通外科杂志, 1999, 8(5): 363-365.
- [9] 朱国献, 朱小兵, 林勇杰, 等. 细针穿刺标本中端粒酶活性检测对甲状腺癌的诊断 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(5): 349-352.

本刊荣获第二届湖南省“双十佳期刊”

2005年1月18日由中共湖南省委宣传部、省新闻出版局、省科学技术厅联合组织的第二届湖南省“双十佳期刊”评选揭晓,这次共评选出“十佳社科期刊”及“十佳科技期刊”。《中国普通外科杂志》荣获“十佳科技期刊”。

这次获奖是继本刊获“全国高校优秀科技期刊”之后的又一喜讯。在此,我们向多年来关心我刊的各级领导、向多年来为我刊逐步成熟与提高付出辛勤劳动的全体编委及专家、向多年来一如既往地支持我刊工作的广大作者、读者深表谢意。