

前哨淋巴结活检在胃癌外科中的应用

陆 林, 邢承忠, 徐惠绵, 郑 彬

陆林, 邢承忠, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科
辽宁省沈阳市 110001

郑彬, 锦州市中心医院普通外科 辽宁省锦州市 121000

辽宁省教育厅课题资助项目, No. 202013171

项目负责人: 邢承忠, 110001, 沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科, xcz1966@yahoo.com.cn
电话 024-23256666-6227

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 探讨胃癌前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)的临床应用及临床意义。

方法: 40 例胃癌患者作为研究对象, 于术中肿瘤四周注射亚甲兰, 寻找并摘取最早蓝染集中的淋巴结, 即前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)。所取得的SLN进行HE染色组织学检查及CK20、CEA抗原表达的免疫组化方法检查。

结果: 40 例胃癌患者中取得SLN的38例, 检出率为38/40 (95%), 术后病理证实 I、II 期胃癌 15 例, III、IV 期胃癌 25 例。由SLNB预测胃周淋巴结转移 I、II 期胃癌的准确率 93.33%, III、IV 期的准确率 69.57%; 特异性均为 100%; I、II 期胃癌的灵敏性 87.5%, III、IV 期的灵敏性 68.18%。

结论: SLNB是预测胃癌淋巴结转移的一种有效方法, 他能准确的预测 I、II 期胃癌胃周淋巴结转移情况, 而在 III、IV 期胃癌中SLNB不能准确预测胃周淋巴结转移情况。

陆林, 邢承忠, 徐惠绵, 郑彬. 前哨淋巴结活检在胃癌外科中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2883-2886
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2883.asp>

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首。根治性手术是治疗胃癌最可靠的方法, 他包括充分切除患癌脏器, 彻底清除区域淋巴结, 完全杀灭腹腔脱落癌细胞^[1]。胃癌淋巴结转移状态不仅与预后有关, 而且也涉及淋巴结清扫范围^[2]。不必要的扩大根治术往往是增加手术死亡率的原因, 但至今为止还没有一种可靠的方法在术前或术中预测胃癌的淋巴结转移的状态。前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)是接受肿瘤转移的第一个淋巴结, 他反映肿瘤的转移情况, 近年来胃癌的前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)也逐渐引人关注。我们应用生物染料法示踪 SLN, 并采用常规病理及免疫组化方法检测 SLN, 以判定 SLN 预测胃周淋巴结转移状态的准确率、敏感性及特异性, 探讨 SLN 在胃癌外科中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院 40 例胃癌患者, 男 28 例, 女 12 例, 年龄 36-79 岁(平均 55.8 岁)。术前均行纤维胃镜检查及病理活检以明确诊断。所有患者均行胃癌根治术, 手术后均行系统病理检查, 常规分组剥离淋巴结, 胃癌分期及淋巴结分组分站均参照日本胃癌学会制定的第 13 版日本胃癌处理规约^[3]及国际 TNM 分期标准。

1.2 方法

1.2.1 SLN 标记及检出方法 手术开腹后, 常规探查腹腔, 然后探查及确认肿瘤部位。用 5 mL 注射器抽取 4 mL 亚甲兰液(1% 亚甲兰注射液, 按 1:1 比例, 以注射用水稀释), 注射器连接 5 号头皮针或蓝芯注射针头, 在紧邻肿瘤周围 1 cm 内的正常胃壁上选对称四点注射, 每点注射剂量为 1 mL, 注射后即可见到蓝染料沿淋巴管向大小弯流动。注射后 5-10 min 内沿染色淋巴管寻找兰染集中的淋巴结(即 SLN), 将其切除, 单独选检。胃癌及淋巴结标本经 40 mL/L 多聚甲醛缓冲液固定, 常规石蜡包埋。每例患者的每枚 SLN 包埋于一个蜡块, 每只蜡块进行连续切片, 切片厚度为 5 μ m, 进行 HE 染色常规组织学检查, 并行免疫组化染色检测 CK20 和 CEA 抗原的表达。

1.2.2 免疫组化检测方法 采用 PV-9000 二步法免疫组化染色, 试剂盒购自美国 Zymed 公司。石蜡切片经二甲苯脱蜡、酒精处理, 浸入 30 mL/L 的 H₂O₂ 中 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 然后蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min, (行 CK20 检测的切片须行高压锅加热抗原修复, 冷却, PBS 冲洗)滴入鼠抗人-抗工作液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, PBS 冲洗, 2 min, 3 次, 滴加聚合物辅助剂(Polymer Helper), 室温 20 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次, 滴加辣根酶标记羊抗小鼠 IgG 多聚体(Poly peroxidase-antimouse IgG), 室温 20 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次, DAB 显色苏木素复色, 脱水、透明、封片。

1.2.3 结果判定 CK20 和 CEA 阳性反应物主要定位于胞质, 呈棕黄色颗粒着色。CK20 和 CEA 抗体与正常细胞的交叉反应, 可通过其细胞大小、形态及胞核的特性与淋巴结中转移癌细胞相鉴别, HE 染色检测阴性而 CK20 或 CEA 抗体免疫组化检测阳性的淋巴结均视为微转移^[4-5]。

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件, 数据行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 胃癌 SLN 的分布 40 例胃癌中有 38 例找到 SLN, 检出率为 95%(38/40), 共送检 SLN 84 枚, 平均每例摘取 2.21 枚(1-5 个), 多位于肿瘤周围第 I 站淋巴结中, 胃

下部癌 SLN 多位于 No(3)和 No(6)淋巴结;胃中部癌 SLN 多位于 No(3)和 No(4)淋巴结;胃上部癌 SLN 多位于 No(1)淋巴结。3 例 SLN 出现在第 II 站淋巴结中(3/38, 7.89%), 这 3 例出现在 No(7)和 No(8)淋巴结, 其中 1 例仅出现在 No(7)淋巴结。

2.2 胃癌 SLN 阳性率和微转移检查 术后病理证实, 40 例胃癌中 I、II 期占 15 例; III、IV 期 25 例, 2 例未找到 SLN, 其中 1 例为 III 期, 另 1 例为 IV 期。检出的 84 枚 SLN, 用 HE 染色方法及用 CK20、CEA 抗体免疫组化方法检测分别发现 41、46、44 枚淋巴结转移(SLN+)。其中 HE 染色常规病理检查方法阳性的 SLN, CK20 及 CEA 抗原免疫组化检测也均为阳性。各种方法检测后总的阳性淋巴结总数为 47 枚, 其中 6 枚淋巴结为微转移。6 枚微转移的淋巴结出现在 5 个 III 期病例中, 其中 CK20+、CEA- 者 2 例; CK20+、CEA- 者 3 例; CEA+、CK20- 者 1 例(表 1)。

2.3 胃癌 SLN 预测胃癌淋巴结转移 找到 SLN 的 38 例中, 有 22 例前哨淋巴结存在转移, 其中 15 例非前哨淋巴结(non-SLN)亦存在转移, 7 例前哨淋巴结为胃周淋巴结惟一转移部位。有 16 例 SLN 无转移, 其中 8 例 non-SLN 存在转移。由 SLNB 预测胃周淋巴结转移情况, 准确率 78.95%(30/38)、敏感性 73.33%(22/30)、特异性 100%(8/8)。15 例 I、II 期胃癌中, 7 例前哨淋巴结有转移(5 例为胃周淋巴结惟一转移部位), 8 例前哨淋巴结无转移(1 例非前哨淋巴结存在转移), 由 SLNB 预测胃周淋巴结转移状态的准确率为 93.33%(14/15)、敏感性 87.5%(7/8)、特异性 100%(7/7)。III、IV 期胃癌 23 例中, 有 15 例前哨淋巴结存在转移, 其中 13 例非前哨淋巴结也存在转移(2 例为胃周淋巴结惟一转移部位), 8 例前哨淋巴结无转移, 其中 7 例非前哨淋巴结存在转移, 由 SLNB 预测胃周淋巴结转移情况的准确率为 69.57%(16/23)、敏感性 68.18%(15/22)、特异性 100%(1/1)。I、II 期胃癌 SLNB 的准确率、敏感性明显高于 III、IV 期胃癌 SLNB($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 不同染色方法 SLN 和微转移情况

染色方法	SLN+n	阳性比例(%)	微转移 LN 数
HE	41	48.8	
CK20	46	54.8	5
CEA	44	52.3	3
总计	47	55.9	6

表 2 由 SLN 状态预测胃周淋巴结转移情况分析

分期	敏感性(%)	特异性(%)	假阴性率(%)	准确率(%)
I、II 期	87.5 ^a	100	12.5	93.33 ^c
III、IV 期	68.18	100	31.82	69.57
合计	73.33	100	26.67	78.95

^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$ vs III、IV。

3 讨论

SLN 最先由 Cabanas 于 1977 年提出, 他当时在进行阴茎背侧淋巴管造影时发现了一组特殊的淋巴结。在阴茎癌患者中, 这组淋巴结是最先发生转移的淋巴结, 故命名为前哨淋巴结, 并且指出如果前哨淋巴结被检测出有肿瘤转移, 患者需要接受正规的淋巴结清扫术; 反之, 如果 SLN 没有肿瘤转移, 则进一步的淋巴结清扫并非必要的。Morton *et al* 对恶性黑色素瘤和乳腺癌患者的研究, 将前哨淋巴结定义为原发肿瘤区淋巴结引流途径中最先到达的一个或一组淋巴结, 他的位置随原发肿瘤位置改变而改变, 在不同个体中也有所不同^[6]。这是一个在实践基础上抽象而成的定义, 因此为大家普遍认可。从理论上讲, 前哨淋巴结能准确的反映区域淋巴结的转移情况。恶性肿瘤的 SLNB 已成为目前肿瘤学和外科学的研究热点, 被誉为过去 10 a 间肿瘤外科最有影响的进展之一^[7]。有关胃癌的 SLN 研究虽然才刚刚开始, 但其有望在术前或术中准确评估区域淋巴结转移状态。通过对胃癌前哨淋巴结活检, 判断区域淋巴结转移情况, 有可能改变一部分患者的淋巴结清扫方法和范围, 从而使一部分患者受益于微创手术^[8]。

胃的淋巴引流系统高度发达, 因而胃癌的淋巴结转移错综复杂^[9]。尽管经过长期大量的研究, 但胃癌淋巴结的转移规律至今仍不是十分清楚, 总的说大部分胃癌细胞沿区域淋巴结由近及远序贯转移, 但亦有小部分呈现随机性和跳跃性淋巴结转移现象。日本的 Kitagawa 教授强调指出: SLN 并不限定位置, 只要是首先转移的淋巴结就可视为 SLN, 当 SLN 发生在第二或第三站时, 其发挥的功能相当于第一站, 因此胃癌淋巴结转移的跳跃性和随机性并不构成胃癌 SLN 检测的障碍, 相反, 体现了胃癌 SLN 检测的必要性^[10]。本组实验表明, SLN 多出现在第一站淋巴结中, 38 例中有 35 例 SLN 仅出现在第一站(35/38 92.1%), 但 2 例 SLN 同时出现在第 1、2 站, 1 例 SLN 只单独出现在第 2 站。

胃癌发生微转移的现象较常见^[11]。微转移是指非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肺等组织器官中的微小肿瘤细胞灶, 常无任何临床表现, 常规检查方法包括普通病理检查等都很难发现, 微转移细胞能否在宿主组织器官形成转移灶, 取决于癌细胞的生物学特性、机体的免疫状态以及宿主组织器官微环境, 多数发生凋亡, 少数进入休眠甚至增生^[12]。然而, 微转移是肿瘤转移、复发的基础和前提, 微转移的检测有利于判断预后, 指导治疗。前哨淋巴结活检可以为精确的临床分期提供重要的依据。对 SLN 重点和强化的病理检查(连续薄层切片、免疫组化染色、RT-PCR), 可以使病理医生通过最小的投入而发现早期不易为常规染色所检测出的隐匿转移或微转移灶^[13]。对胃癌而言, 淋巴结状态是决定分期的重要因素之一, 也是判断预后及指

导治疗的重要指标.我们用免疫组化方法检测SLN中的CK20和CEA抗原表达,可以准确评估胃癌患者SLN中微转移情况.CK20是角蛋白的一个亚型,为细胞骨架的组分之一,CK20的上皮细胞特异性更为严格,正常组织中,仅见于胃肠道和泌尿道黏膜细胞,其他如乳腺、平滑肌、血细胞、淋巴细胞和骨髓细胞均为阴性.CK20的表达在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移等改变时持续表达阳性^[14].CEA在所有的胃癌细胞系中,不论其分化程度如何均有表达,但在正常的淋巴细胞中不表达^[15].因而这两种抗原可作为检测淋巴结中胃癌细胞的标记物,应用免疫组化方法检测CK20、CEA抗原表达,方法简便、直观,且能尽可能多的发现微转移,提高判定胃周淋巴结转移及分期的准确性.我们应用CK20和CEA抗体检测SLN,发现5例患者共6枚SLN有微转移,说明联合应用可提高微转移的检出率.文献报道^[16-17],常规病理检查阴性的患者中,出现淋巴结微转移的比例为9-33%之间.本组为6/43(13.95%).应用CK20、CEA抗体免疫组化方法检测SLN,可以更准确的进行临床分期,判断预后及指导治疗,从而促进胃癌整体诊治水平的进一步提高.

对于胃癌SLN的检出方法,至今仍无一种共识的统一标准.生物染料的选择、染料注射部位及方法,注射后摘取SLN的时机及SLN病理检查仍缺乏一致标准^[18].目前,亦有应用放射胶体示踪的方法,可以检出位置较深和较远的淋巴结,但也存在放射性对比差异及病灶部残留放射性的干扰问题.生物染料法SLN的检出率为92-99%^[19-20].Hiratsuka *et al*应用染料法检测胃癌SLN,每例摘取 2.6 ± 1.7 个SLN^[19].我们采用亚甲兰四点注射,注射时采用5号头皮针潜行刺入浆膜,并边注射边撤出针头,以加大点注射的范围,也能防止蓝染料溢出污染周围组织影响观察.我们的检出率为38/40(95%),平均每例摘取2.21个淋巴结,2例未找到SLN的属Ⅲ、Ⅳ期胃癌,可能是由于淋巴管内癌转移使之闭塞,蓝染料无法到达SLN所致.

胃癌的预后与淋巴结有无转移有密切关系,所以对SLNB而言SLN的组织学状态预测胃周淋巴区域转移情况的准确性是十分重要的,也是SLNB临床意义的表现.我们的实验,38例找到SLN的病例中,由SLN状态预测胃周淋巴结转移情况的准确率为78.95%,Ⅰ、Ⅱ期胃癌为93.33%,Ⅲ、Ⅳ期胃癌为69.57%;敏感性为73.33%,Ⅰ、Ⅱ期为87.5%,Ⅲ、Ⅳ期为68.18%;假阴性率为26.67%,Ⅰ、Ⅱ期为12.5%,Ⅲ、Ⅳ期为31.82%.说明SLNB在Ⅰ、Ⅱ期胃癌中的准确性较高,即SLN在Ⅰ、Ⅱ期胃癌中较准确地预测胃周淋巴结状态,而在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中,SLNB的准确性低,假阳性率高.我们分析在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中,肿瘤已浸及浆膜,黏膜下淋巴管网被扰乱,已发生转移的可能性大,肿瘤最先转移的淋巴结(SLN)早已被癌细胞占据或阻塞,此时应用生物染料示踪SLN,则无法找到真正

的SLN,所以我们考虑对Ⅲ、Ⅳ期胃癌,应采用一种新的示踪方法来寻找SLN.总之,SLNB是预测胃癌淋巴结转移的一种有效方法,他能准确的预测Ⅰ、Ⅱ期胃癌胃周淋巴结转移情况,而在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中SLNB不能准确预测胃周淋巴结转移情况.

4 参考文献

- 1 张文范,张荫昌,陈峻青.胃癌.第2版.上海:上海科学技术出版社,2001:10
- 2 陈峻青.关于胃癌、大肠癌淋巴结转移诊断和治疗的若干问题.中华医学杂志 2000;20:69-70
- 3 陈峻青.日本胃癌处理规约第13版重要修改内容简介.中国实用外科杂志 1997;77:645-646
- 4 Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79:1069-1076
- 5 夏加增,朱正刚,刘炳亚,燕敏,尹浩然.免疫组化检测胃癌淋巴结微转移的意义.世界华人消化杂志 2000;8:1113-1116
- 6 Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-399
- 7 Tsioulis GJ, Wood TF, Morton DL, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes up-stage gastrointestinal neoplasms. *Arch Surg* 2000;135:926-932
- 8 Palaia R, Cremona F, Delrio P, Izzo F, Ruffolo F, Parisi V. Sentinel node biopsy in gastric cancer. *J Chemother* 1999;11:230-231
- 9 Sano T, Katai H, Sasako M, Maruyama K. Gastric lymphography and detection of sentinel nodes. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:253-258
- 10 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, Ohgami M, Otani Y, Ozawa S, Hasegawa H, Furukawa T, Kumai K, Ikeda T, Nakahara T, Kubo A, Kitajima M. The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. *Surg Clin North Am* 2000;80:1799-1809
- 11 Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H. Can sentinel node biopsy indicate rational extent of lymphadenectomy in gastric cancer surgery? Fundamental and new information on lymph-node dissection. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:149-157
- 12 Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340:685-689
- 13 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Ozawa S, Ohtani Y, Furukawa T, Yoshida M, Nakamura E, Matsuda J, Shimizu Y, Nakamura K, Kumai K, Kubo A, Kitajima M. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node sampling in esophageal and gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:293-304
- 14 Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Grone J, Rokos F, Buhr HJ, Thiel E, Keilholz U. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer* 2004;108:219-227
- 15 Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, Mafune K, Tange T, Tatematsu M, Kaminishi M. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 2003;105:136-143
- 16 Isozaki H, Kimura T, Tanaka N, Satoh K, Matsumoto S, Ninomiya M, Ohsaki T, Mori M. Esophagus gastrointestinal surgical treatment study group. An assessment of the feasibility of sentinel lymph node-guided surgery for gastric cancer. *Gastric Cancer* 2004;7:149-153
- 17 Dowlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, Spitz DJ, Patel S, Snider

- HC Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-996
- 18 Pfeifer JD. Sentinel lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:599-602
- 19 Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H,

- Motomura K, Ohigashi H, Kameyama M, Sasaki Y, Kabuto T, Ishiguro S, Imaoka S, Koyama H. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001;129:335-340
- 20 Wong JH, Steinman S, Calderia C, Bowles J, Namiki T. Ex vivo sentinel node mapping in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 2001;233:515-521

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 筛选与克隆HBcAg激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制。

方法: 以分子生物学技术构建HBcAg的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBcAg, 以表达质粒pcDNA3.1(-)-HBcAg转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: HBcAg表达质粒pcDNA3.1(-)-HBcAg经酶切鉴定和DNA测序鉴定正确. 经基因表达谱芯片分析, 29种基因的表达水平上调, 17种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到一些与细胞内信号传导、免疫调节、细胞凋亡、蛋白质翻译合成、肿瘤发生相关的HBcAg反式调节的靶基因。

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬. 应用表达谱芯片技术筛选HBcAg反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2886-2890
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2886.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝DNA病毒, 是一种严重

危害人类健康的致病因子. 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1]. HBcAg是由HBV DNA C基因区编码的一种结构性蛋白, 有保守的三维结构, 可因血清型不同而有183-185个氨基酸残基(aa), 在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中, 病毒核心抗原(HBcAg)、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒DNA的合成^[2-3]. 基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上制成芯片, 将两组组织或细胞的mRNA逆转录成cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因^[4-7]. 为从不同角度对HBcAg的反式调节基因进行验证及了解HBcAg对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在HBcAg基因转染后差异表达的基因谱的变化。

1 材料和方法

1.1 试剂 HepG2细胞及感受态*E.coli* JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6转染试剂, 总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, mRNA Purification试剂盒购自Amersham Pharmacia Biotech, 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供. pcDNA3.1(-)-HBcAg表达载体由本室构建。

1.2 目的基因的扩增与纯化 以质粒pCP10中所含的HBV ayw亚型的DNA序列为模板, 用PCR方法扩增HBcAg基因片段. 上游引物为: 5'-GCT AGC CAT GGA CAT CGA CCC TTA TA-3', 下游引物为: 5'-GGT ACC CTA ACA TTG AGG TTC CCG AG-3'. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 以GeneClean II kit (Bio 101公司)回收纯化550 bp DNA条带。