

# 实时荧光定量 PCR 检测原发性肝癌中 PRL-2 基因的表达

程 超<sup>1</sup>, 郭爱林<sup>2</sup>, 巫国勇<sup>1</sup>, 谢春玲<sup>1</sup>, 吴伟康<sup>3</sup>

( 1. 中山大学附属第一医院胸外科; 2. 广东省人民医院医学研究中心; 3. 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080 )

**摘 要:** 【目的】建立 TaqMan 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肝细胞再生磷酸酯酶 2 (PRL-2) mRNA 表达水平, 并应用该法检测原发性肝细胞癌中 PRL-2 基因的表达。【方法】构建含 PRL-2 基因开放阅读框架的 T 载体, 制作标准曲线。提取手术切除 12 例人肝癌、门静脉癌栓(PVTT)和癌旁组织总 RNA 并逆转录为 cDNA。应用实时荧光定量 PCR 法观察人肝细胞癌组织和门静脉癌栓及癌旁组织中 PRL-2 的表达水平。【结果】线性检测范围达 5 个数量级, 最低检测下限为  $1 \times 10^2$  拷贝, 最高检测上限为  $1 \times 10^6$  拷贝。PRL-2 在所有的门脉癌栓及 10 例肝癌组织表达, 仅在 4 例癌旁组织中表达。门脉癌栓 PRL-2 mRNA 表达水平显著高于肝癌及癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 肝癌组织表达显著高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ )。【结论】实时荧光定量 PCR 可以准确定量测定 PRL-2 基因的表达; PRL-2 基因在门脉癌栓的更高表达提示其在肝细胞癌的发生、转移中可能起重要作用。

关键词: 肝细胞癌; 聚合酶链反应; 基因表达; PRL-2 基因

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0702-04

## Real-time Fluorescence Quantitative PCR in Detecting PRL-2 Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma

CHENG Chao<sup>1</sup>, GUO Ai-lin<sup>2</sup>, WU Guo-yong<sup>1</sup>, XIE Chun-lin<sup>1</sup>, WU Wei-kang<sup>3</sup>

( 1. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Medical Research Center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Pathophysiology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China )

**Abstract:** 【Objective】 To quantitatively detect the mRNA expression level of PRL-2 in primary hepatocellular carcinoma with RT-PCR method. 【Methods】 T vector including open reading frame of PRL-2 gene was constructed to make standard curve. The total RNA isolated from human HCC, portal vein tumor thrombosis (PVTT) and adjacent liver tissue was reversely transcribed into cDNA. The RT-PCR method was used to analyze the expression level of PRL-2 gene. 【Results】 The RT-PCR method was performed successfully to precisely detect RNA level ranging from  $1 \times 10^2$  copies to  $1 \times 10^6$  copies. PRL-2 was expressed by all the portal vein tumor thrombosis (PVTT) and 10 cases HCC, but only by 4 cases paratumor tissue. The expression level of PRL-2 gene was higher in PVTT than that in paratumor liver tissues and in HCC ( $P < 0.01$ ), and it was higher in HCC than that in paratumor liver tissues. 【Conclusion】 The RT-PCR is the precise method to quantitatively detect PRL-2 gene RNA level. The higher expression of PRL-2 gene in PVTT suggesting that it may play an important role in the development and metastasis of the HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; polymerase chain reaction; gene expression; PRL-2 Gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):702-705]

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(30100218); 广东省科技计划项目(2004B30301010; 2005B30301021)

作者简介: 程 超 (1974-), 男, 浙江永康人, 肿瘤学博士, 主治医师, 主要从事肿瘤的多学科综合治疗、个体化治疗及分子生物学的研究; 郭爱林, 通讯作者, E-mail: alinguo@163.com

肝细胞再生磷酸酯酶 (phosphatase of regenerating liver, PRL)是一类新发现的小分子酪氨酸蛋白磷酸酯酶,由PRL-1、PRL-2和PRL-3三个成员组成<sup>[1]</sup>。它们具有酪氨酸蛋白磷酸酯酶共同活化序列HCXXGXXR,分子量约为20 ku,氨基酸同源性超过76%<sup>[2,3]</sup>。最近的研究表明,PRL-1、PRL-3与肿瘤的转移密切相关,特别是PRL-3与结肠癌、胃癌和黑色素瘤的远处转移存在密切相关性<sup>[4-6]</sup>。而PRL-2与肿瘤发生和转移的关系尚少见文献报道,为此我们建立了实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR,QT-PCR)检测PRL-2基因的方法,并对PRL-2 mRNA在肝癌中的表达进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 肝癌组织

12例新鲜肝癌、门静脉癌栓和癌旁肝脏组织来自2001年-2003年中山大学附属第一医院手术标本,手术切除组织立即液氮冻存。肿瘤组织均经病理检查证实,为肝细胞癌,根据TNM分期<sup>[9]</sup>均为a期。

### 1.2 试 剂

Trizol Reagent、SuperScript 逆转录试剂盒、DNase 购自美国Invitrogen公司,PCR试剂购自上海申能博彩生物公司,引物及荧光探针由上海博亚公司合成。ABI7000荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品。

### 1.3 总 RNA 抽提及反转录

取冻存组织100 mg,加入Trizol Reagent 1 mL,匀浆后加入0.2 mL氯仿,离心后吸取上清,加入0.5 mL异丙醇,离心沉淀后弃上清,70%乙醇洗沉淀,DNase I酶解可能残余的基因组DNA, RNA溶于DEPC水,甲醛变性凝胶电泳和以260 nm及280 nm吸光度值计算所获RNA含量及纯度,分装后-80℃保存待用。反转录操作按Superscript (Invitrogen公司)提供操作说明书进行,所得cDNA-20℃保存。

### 1.4 PRL-2 T 载体的构建及标准品的制备

PRL-2引物设计:5端引物:ggatccact ATGGACCGTCCAGCCC,3端引物:ctcgagCTACT GAACACAGCAATGCC,由上海生工公司合成引物。

收集对数生长期的HepG2细胞,约 $1 \times 10^7$ ,按照Trizol的说明提取RNA,经紫外分光光度仪测定 $A_{260}$  nm定量,取1  $\mu$ g RNA为模板,采用one-step RT-PCR扩增特异性PRL-2片段(504 bp)。扩增产物用10 g/L琼脂糖凝胶进行电泳。鉴定条带的位置正确后,切下目的条带,参照柱式小量胶回收试剂盒中的操作说明,回收、纯化,装入pMEM T easy载体,并经测序证明确实含有PRL-2 504 bp片段。重组T载体经碱裂解法抽提及PEG纯化后,以260 nm吸光度测定含量,根据载体分子量计算其拷贝数,以10倍进行连续稀释,得到拷贝数分别为 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 和 $1 \times 10^1$ / $\mu$ L的样品,即可作为制备Q-PCR标准曲线的标准品。

### 1.5 引物与TaqMan探针

引物和探针序列均由ABI Primer Express 2.0软件辅助设计。PRL-2引物:上游5'-ACCAATGCTACTCTCAACAAGTTCA-3';下游5'-TGGCCAATCTAGAACGTGGATT-3'(131 bp);探针序列:5'-FAM-TAAGAAGTATGGAGTGACGACT-TAMRA 3'由上海基康公司合成。

### 1.6 TaqMan Q-PCR

PCR体系总量25  $\mu$ L cDNA 2  $\mu$ L, 10  $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, Taq酶2.5 U, 100 mmol/L引物及探针各0.1  $\mu$ L,加双蒸水至25  $\mu$ L。PCR条件为:94℃ 5 min后,以92℃ 30 s,60℃ 30 s循环40次。设定在每个循环的变性期结束后,程序自动记录上一循环最后10%时间的平均荧光值,以表示在该循环结束时的PCR产物的量。荧光种类选择FAM-490,程序将按照设定的激发和发射光谱选择滤镜组,分别为490 nm和530 nm。反应完成后,得到含所有标本的记录点曲线,选择PCR baseline subtracted (PCR基线扣除)模式进行数据分析和修正。在调整Baseline cycles (基线循环)和计算Threshold value (阈值)后,计算出Threshold cycle (Ct值)。Ct值和起始拷贝数有着对应关系,可通过外标准曲线精确计算样品的起始拷贝数。

### 1.7 数据处理

ABI7000荧光定量PCR仪检测结果由ABI7000 Prism Software 1.1系统进行分析,标本重复性及组间差异比较采用SPSS 10.0进行统计。

## 2 结 果

### 2.1 标准曲线的建立及线性检测范围

成功地建立了人 PRL-2 cDNA 标准曲线 (图略),其线性范围可达 5 个数量级,最高检测上限为  $1 \times 10^6$  拷贝,最低检测下限为  $1 \times 10^2$  拷贝。标准曲线的直线回归相关系数  $r = -0.998$ ,斜率为 -3.52。

### 2.2 灵敏度及特异性检测

为了验证 TaqMan 方法的特异性,我们将拷贝数分别为  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10$  的标准品经 PCR 扩增和 1.1 系统分析,产物进行 3% 琼脂糖电泳(图 1)。电泳图显示,各泳道在 130 bp 左右的位置均有特异性条带出现,并且荧光强度随起始模板数的递减有逐步降低的趋势。值得注意的是  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3$  之间的 4 个条带差别不明显。上述结果说明单靠普通的半定量 PCR 是无法准确预测初始拷贝数的。我们将特异性条带切下后,装入 pGEM Teasy 载体,以 M13 primers 进行测序,结果正确,从而保证了方法的特异性。本研究设定大于 40 个循环仍无荧光信号明显增强为阴性标本。当以标准品进行 10 倍连续稀释,发现最低可以检测  $1 \times 10^2$  拷贝,最高可检测到  $5 \times 10^6$  拷贝。将正常肝细胞系 CL-1 总 RNA 作为模板,该样本 PRL-2 mRNA 表达量均  $< 10^2$  拷贝,检测结果阴性,故该方法的灵敏度约为 100 拷贝。

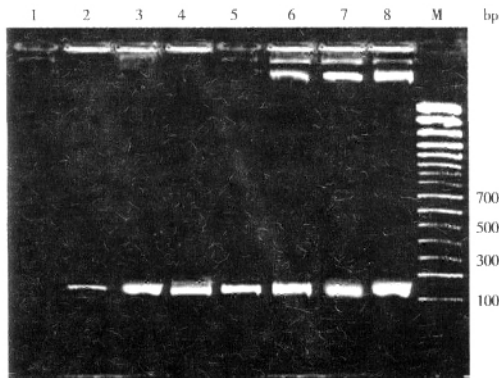


图 1 标准品 Q-PCR 产物电泳图

Fig.1 The agarose gel electrophoresis of Q-PCR product of the standard sample

### 2.3 方法的重复性

将 5 个不同稀释度的标准品 ( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$  拷贝)分 6 批次进行检测,以拷贝数得其批间变异(CV)

分别为 21.2% ,17.8% ,11.4% ,26.5% ,46.8% ;我们将上述 5 个标准品一式 3 份检测,以拷贝数计算其批内 CV 分别为 32.1% ,14.2% ,10.7% ,21.6% ,40.3%。上述结果表明该方法的重复性好,特别是在浓度较低的情况下。

### 2.4 PRL-2 在肝癌、癌栓和癌旁组织中的表达

Q-PCR 技术检测发现 12 例肝癌患者门脉癌栓和 10 肝癌组织可检测到 PRL-2 mRNA 表达,但是仅有 4 例癌旁组织可以检测到 PRL-2 mRNA 表达。2 例肝癌组织内未检测到 PRL-2 表达的患者,8 例癌旁组织内亦未检测到 PRL-2 表达。其中门脉癌栓表达水平平均高于肝癌组织将近 100 倍 ( $P < 0.01$ );肝癌组织比癌旁组织表达高出将近 10 倍 ( $P < 0.01$ ,表 1)。PVTT 和肝癌组织 mRNA 表达的相关系数为 0.778。

表 1 肝癌、癌栓和癌旁组织中 PRL-2 mRNA 的表达水平  
Table 1 The expression of PRL-2 mRNA in the HCC,PVTT and paratumor tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

Tissue	n	Copies/ $\mu$ g total RNA
PVTT group	12	$5.6 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$ <sup>1)2)</sup>
HCC group	10	$6.4 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ <sup>3)</sup>
Paratumor group	4	$7.1 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$

The comparison between 3 group rates:  $\chi^2=25.326$ ,  $P < 0.01$ . The further comparison between two groups, Fisher's exact test was used: 1) Compared with the HCC group,  $P < 0.005$ ; 2) Compared with the paratumor group,  $P < 0.001$ ; 3) Compared with the paratumor group,  $P=0.005$

## 3 讨 论

### 3.1 RT-PCR 技术的原理及其优越性

多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术发明至今已近 20 年了,在这期间其技术得到了不断的发展,于 1996 年推出的 Q-PCR 技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃。Q-PCR 是一种用于定量测定起始模板拷贝数的新技术,其原理为:在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,荧光信号的强弱与靶基因的量即扩增产物的量成正比关系<sup>[10,11]</sup>,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该方法与常规 PCR 相比,具有特异性更强、有效解决 PCR 污染和自动化程度高等特点,目前已得

到广泛应用。

### 3.2 RT-PCR方法定量测定PRL-2表达

由于mRNA用Q-PCR方法进行定量时,还需考虑到反转录效率以及mRNA容易降解等问题,因此我们通过T载体克隆方案构建含PRL-2基因的载体,用所提取质粒DNA作为实时荧光定量RT-PCR的标准模板,具有纯度高、来源广、易于保存、定量准确等优点,可长期用于检测。经过对质粒模板进行不同浓度梯度稀释,检测扩增过程中荧光信号强弱来制备标准曲线,相关性好,斜率达-3.52,显示出随不同模板量而出现CT值良好的变化。在以往的PRL表达的研究中,大部分的工作采用了原位杂交、RT-PCR和Northern blot方法<sup>[6-8]</sup>,但是上述方法只能半定量分析,不能在mRNA水平定量准确检测表达。而应用Q-PCR技术可以对mRNA水平进行实时定量分析。对12例肝癌的PRL-2基因的表达水平分析发现,肝癌中PRL-2的表达水平普遍升高,而且所有PVTT的mRNA水平是肝癌组织的800倍以上,肝癌组织表达水平是癌旁组织的8倍以上,说明PRL-2作为在肿瘤发生发展中的重要分子可能发挥了特殊的作用。表达上调不但具有普遍性,而且具有极为明显的差异,提示可以用于癌肿复发或转移的预测和监视。

参考文献:

- [1] ZENG Q, SI X, HORSTMAN H, et al. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (28): 21444-21452.
- [2] DIAMOND R H, CRESSMAN D E, LAZ T M, et al. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 3752-3762.
- [3] ZENG Q, HONG W, Tan Y H. Mouse PRL-2 and PRL-3, Two Potentially Prenylated Protein Tyrosine Phosphatases Homologous to PRL-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244(2): 421-427.
- [4] BESSETTE D C, WONG P C, PALLEN C J. PRL-3: a metastasis-associated phosphatase in search of a function [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3):232-236.
- [5] ACHIWA H, LAZO J S. PRL-1 tyrosine phosphatase regulates c-Src levels, adherence, and invasion in human lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 643-650.
- [6] PENG L, NING J, MENG L, et al. The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004,130(9):521-526.
- [7] MISKAD U A, SEMBA S, KATO H, et al. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis [J]. *Pathobiology*, 2004,71(4):176-184.
- [8] MISKAD U A, SEMBA S, KATO H. High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: an in situ hybridization study [J]. *Virchows Arch*, 2007, 450(3): 303-310.
- [9] AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). AJCC cancer staging manual [M]. 5th ed. New York: Lippincott Raven, 1997: 97-101.
- [10] 杜柳涛,庄志雄,高昆,等.人DNA聚合酶全长cDNA的克隆、鉴定及真核表达载体的构建[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2002, 23(3):187-189.
- [11] LUTFALLA G, UZE G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 410:386-400.

(编辑 徐杰)