

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/576 G01N 33/561

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00116716.2

[43]公开日 2002年1月16日

[11]公开号 CN 1331417A

[22]申请日 2000.6.23 [21]申请号 00116716.2

[71]申请人 中国科学院上海细胞生物学研究所

地址 200031 上海市岳阳路320号

[72]发明人 裴 钢 吴国祥 周天华

林义明 高 华

[74]专利代理机构 上海华东专利事务所

代理人 费开逵

权利要求书1页 说明书5页 附图页数1页

[54]发明名称 外周血中肝细胞的检测方法

[57]摘要

一种外周血中肝细胞的检测方法,是临床诊断肝癌的一个辅助手段。该方法步骤:首先是外周血取样,提取RNA及反转录成cDNA,然后进行巢式PCR扩增,再对PCR产物进行电泳分析,从而检出外周血中ALF mRNA及AFP mRNA的表达,以区别良性肝细胞与恶性肝细胞。该方法简便,在肝癌检测中造成的假阳性率仅为10%。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权利要求书

1、一种外周血中肝细胞的检测方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

- (1) 外周血取样，RNA 提取及反转录成 cDNA；
- (2) 外周血肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 扩增；
- (3) PCR 产物分别进行电泳分析，外周血中 ALF mRNA 及 AFP mRNA 两者阴性，结果作为良性肝细胞的指标；AFP mRNA 阳性结果，而 ALF mRNA 阴性结果则作为恶性肝细胞的指标。

2、如权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于所述外周血肝细胞 ALF cDNA 的巢式 PCR 用的引物是：

GGTTTCTACAAAGATGAAACTAC 和 CATTCTCTTCGGGATCCAG 作外引物，
TGAAACTACTAAAACCTTACAGG 和 GCAGAAATCCCACATCAGATT 作内引物。

说明书

外周血中肝细胞的检测方法

本发明涉及到有关临床肝癌诊断中采用的检测方法，尤其是关于外周血中肝细胞的检测新方法。

肝癌是遍及全球的死亡率高的癌症之一。尽管目前对肝癌相关的一些病理学因素有了较好的认识，但引起肝癌的分子机理仍不清楚。肝胆切除术仅是肝癌形成期的有效治疗，而不适合于肝外转移的肝癌患者。外周恶性细胞的检测对证明癌微小的转移、设计治疗策略、估价治疗效果和预见外科手术后复发的可能性很有帮助(Akriviadis EA.et al.,Br J Surg 1998;1319-1331)。

α -白蛋白(ALF)与肝癌的一种广泛应用的诊断指标 α -甲胎蛋白(AFP)具有高度同源性，但它与肝癌的关系仍没有报道。白蛋白基因家族由四个基因编码的白蛋白、ALF、AFP和维生素D粘合蛋白组成，它们连续排列在4号染色体短臂亚着丝粒位点(Lichenstein HS.et al.,J Biol Chem1994;269:18149-18154. ;Nishio H. Et al., J Mol Biol 1996;259:113-119)。在这些蛋白基因中，AFP选择性地胎儿的肝中表达，而ALF和维生素D粘合蛋白的表达限制于新生儿和成人的肝中。然而，在60-70%的肝癌细胞中AFP表达出现再活化，且刺激肝癌细胞生长是AFP的生物学功能之一。由于AFP基因异常表达是肝癌患者的主要特征之一，所以血清AFP被作为肝癌的一种诊断指标。从肝癌原发灶释放的外周血肝癌细胞通常用来检测肝癌患者不同时期的肝外转移。尽管外周血中，AFP信使RNA(mRNA)表达通常作为血源性脱落的肝癌细胞的一种指标，但在肝硬化患者检测中AFP mRNA表达的假阳性结果占相对高的百分比(达30%) (Funaki NO. Et al., Life Sci 1998;62:1973-1984. ; Matsumura M.et al., hepatology 1994;20:1418-1425)。

AFP 被广泛地研究，但 ALF 和肝癌的关系已知的很少。AFP mRNA 表达作为血源性脱落的肝细胞的一种指标检测灵敏度不高，而白蛋白 mRNA 在正常人外周血中也表达，因而没有特异性 (Muller C. Hepatology 1997;25(4):896-9.)。因此，研究 ALF mRNA 表达与肝脏疾病之间的关系是一个新的课题。

为此，本发明的目的是提供一种外周血中肝细胞检测的新方法，作为检测肝癌的一个辅助手段。通过检测外周血中肝细胞 ALF mRNA 表达和 AFP mRNA 表达，区别正常肝细胞和恶性肝细胞，从而为临床诊断肝脏疾病提供更可靠、有力的证据，降低肝硬化所造成的假阳性结果，以利于临床诊断治疗肝癌。

本发明一种外周血中肝细胞检测的新方法是采用外周血取样、巢式 PCR 技术，检测外周血中肝细胞 ALF mRNA 表达，结合检测外周血中肝细胞 AFP mRNA 表达，从而提供一种外周血中肝细胞检测的新指标，它包括以下步骤：

1. 外周血取样，RNA 提取及反转录成 cDNA

从肝癌患者取外周血样品，肝素化。对照的外周血样品从正常人身上获得。血样立即用于 RNA 提取。然后进行反转录，加入 RNA，随机引物，核糖核酸酶抑制剂，dNTPs，反转录缓冲液及反转录酶，使 mRNA 反转录成 cDNA。

2. 外周血肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 扩增

外周血肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 扩增按下列两引物进行，ALF 的 PCR 引物用 GGTTTCTACAAAGATGAACTAC 和 CATTTCTCTTCGGGATCCAG 作外引物，用 TGAAACTACTAAAACCTTACAGG 和 GCAGAAATCCCACATCAGATT 作内引物。AFP 的 PCR 引物用 CTGCAAACCTGACCACGCTG 和 TGCTTGGCTCTCCTGGATG 作外引物，用

GGTCAATGTATAATTTCATGCAG 和 ATTTCTGTAATTCTTCTTCTCC 作内引物。

3、PCR 产物分别于 2%琼脂糖凝胶上进行电泳分析

由统计结果可以看出，正常人外周血中 ALF mRNA 和 AFP mRNA 都不表达；肝癌患者 AFP mRNA 检出率为 93%， ALF mRNA 检出率为 10%。因而可以把外周血中 ALF mRNA 表达作为检测肝癌的一个辅助指标。即外周血中 ALF mRNA 和 AFP mRNA 的阴性结果作为良性肝细胞的指标，AFPmRNA 的阳性结果而 ALF mRNA 的阴性结果作为恶性肝细胞的指标。

因此，检测个别患者外周血中肝细胞时通过下列步骤进行：外周血取样，提取 RNA 及反转录成 cDNA；外周血肝细胞中 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR，PCR 产物的凝胶电泳分析。然后，根据结果及其它临床资料对患者作出比较准确的诊断。图 1、图 2 所示是实施例 3 对肝癌患者进行检测的结果，由图 1、图 2 可以看出，正常人外周血中 ALF mRNA 和 AFP mRNA 都不表达；肝癌患者 ALF mRNA 不表达，AFP mRNA 表达。

本发明外周血中肝细胞的检测方法的优点是采用巢式 PCR 这一实验室常用的技术，检测外周血中肝细胞 ALF mRNA 表达，结合 AFP mRNA 表达的检测结果，对肝癌作出初步诊断。对证明癌微小的转移、设计治疗策略、估价治疗效果和预见外科手术后复发的可能性很有帮助。此方法简便，并能将肝硬化在肝癌检测中所造成的高假阳性率 30%降低到 10%。

附图说明：

图 1 是肝细胞 ALF cDNA 的巢式 PCR 产物的电泳检测图

M—肝组织细胞

N—正常人外周血

HCC—肝癌患者外周血

图 2 是肝细胞 AFP cDNA 的巢式 PCR 产物的电泳检测图

M—肝组织细胞

N—正常人外周血

HCC—肝癌患者外周血

本发明通过以下的实施例作进一步阐述，但并不限制本发明的范围。

实施例 1 外周血取样，RNA 提取及反转录成 cDNA

从上海东方肝胆医院的 30 个肝外转移性肝癌患者（肝癌诊断由探针肝活性组织学检查确定，20 男，10 女）各取 5ml 外周血样品肝素化，用于作 ALF mRNA 和 AFP mRNA 表达测定。对照的外周血样品从 20 个正常人（12 男，8 女）身上获得，血样立即用于 RNA 提取。取 5ml 肝素抗凝血加入 30ml NH₄Cl-TRIS 溶液混匀，室温静置 20 分钟使红细胞溶解，离心（5000 RPM）5 分钟，收集沉淀白细胞，加入 1ml TRIZOL 试剂（购自 Boehringer mannheim 公司），用移液器将白细胞反复吹打彻底匀浆，室温静置 5 分钟，加入 200 μl 氯仿，混匀高速离心（12000g）两分钟。将上层水相转移至离心管，加入 500 μl 异丙醇，振荡混匀，室温放置 5 分钟。高速离心（12000g）5 分钟，小心弃上清液，室温静置约 15 分钟使 RNA 恰好干燥，加水溶解。

然后进行反转录，于 20 μl 反应体系中分别加入 5 μg mRNA，随机引物（0.1ng/μl）1.0 μl，核糖核酸酶抑制剂 1.0 μl（10U），2mM dNTPs 2.0 μl，5X 反转录缓冲液 4.0 μl，反转录酶 1.0 μl（10U）（这些均在一 PCR 试剂盒中，购自 GIBCO 公司），于 37℃ 反应一小时，使 mRNA 反转录成 cDNA，95℃ 5 分钟灭活反转录酶。

实施例 2 外周血中肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 扩增

外周血中肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 按下列两引物进行。ALF 的引物按基因库中增加数字 L32140 排序设计，用 GGTTTCTACAAAGATGAACTAC 和 CATTCTCTTCGGGATCCAG 作外引物，用 TGAAACTACTAAACTTACAGG 和 GCAGAAATCCCACATCAGATT 作内引物。AFP 的引物按基因库中增加数字 V01514 排序设计，用

CTGCAAAGTACCACGCTG 和 TGCTTGGCTCTCCTGGATG 作外引物, 用 GGTCATGTATAATTCATGCAG 和 ATTTCTGTAAATCTTCTTCTCC 作内引物。

ALF 的 PCR 反应第一步(94 °C, 5 分钟; 94 °C, 40 秒; 60 °C, 40 秒; 72 °C, 40 秒; 30 个循环; 72 °C, 2 分钟)在 200ml 容器中加入 2 μ l cDNA 液体, 每种外引物 10 pmol 和 2 个单位的 Taq DNA 多聚酶(Life Technologies, Inc)于标准 PCR 缓冲液(200 μ mol/L dNTPs, 1.5mmol/LMgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl, PH8.3, 50mmol/L KCl)中进行。2ml 第一步 PCR 产物和内引物进行第二步 PCR 反应(94°C, 5 分钟; 94°C, 40 秒; 58°C, 40 秒; 72°C, 30 秒; 30 个循环; 72°C, 2 分钟)。AFP 第一步扩增 (94 °C, 5 分钟; 94 °C, 40 秒; 64 °C, 30 秒; 72 °C, 40 秒; 30 个循环; 72 °C, 2 分钟), 第二步扩增 94 °C, 5 分钟; 94 °C, 30 秒; 60°C, 1 分钟; 72°C, 30 秒; 30 个循环; 72 °C, 2 分钟)。PCR 产物于 2%葡聚糖凝胶上电泳。由统计结果可知, 正常人外周血中未检测到 ALF mRNA 和 AFP mRNA; 肝癌患者 AFP mRNA 检出率为 93%, ALF mRNA 检出率为 10%。

实施例 3 肝癌患者外周血中肝细胞的检测

取肝癌患者外周血, 肝素化, 并提取 RNA, 并反转录成 cDNA (方法同实施例 1), 然后进行外周血中肝细胞 ALF cDNA 和 AFP cDNA 的巢式 PCR 扩增 (方法同实施例 2)。结果见图 1 及图 2, 肝癌患者 ALF mRNA 不表达, AFP mRNA 表达。

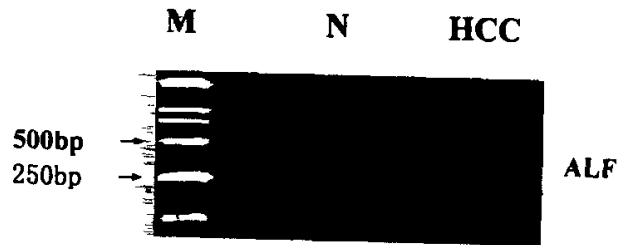


图 1

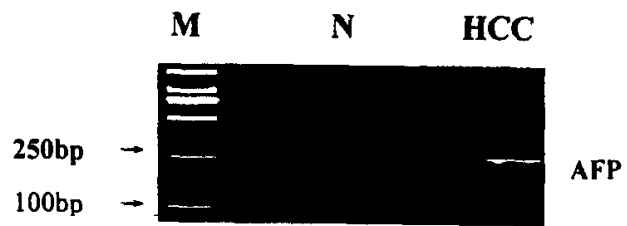


图 2

专利名称(译)	外周血中肝细胞的检测方法		
公开(公告)号	CN1331417A	公开(公告)日	2002-01-16
申请号	CN00116716.2	申请日	2000-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海细胞生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海细胞生物学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海细胞生物学研究所		
[标]发明人	裴钢 吴国祥 周天华 林义明 高华		
发明人	裴钢 吴国祥 周天华 林义明 高华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/561 G01N33/576		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种外周血中肝细胞的检测方法,是临床诊断肝癌的一个辅助手段。该方法步骤:首先是外周血取样,提取RNA及反转录成cDNA,然后进行巢式PCR扩增,再对PCR产物进行电泳分析,从而检出外周血中ALF mRNA及AFP mRNA的表达,以区别良性肝细胞与恶性肝细胞。该方法简便,在肝癌检测中造成的假阳性率仅为10%。

