

吴朋朋,柳森森,张彩勤,等. Alu 基因定量检测用于胃癌转移模型评估的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 440-447.

Wu PP, Liu SS, Zhang CQ, et al. Measurement of Alu gene expression by RT-PCR in the evaluation of models of gastric cancer metastasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 440-447.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2021. 04. 003

Alu 基因定量检测用于胃癌转移模型评估的研究

吴朋朋¹, 柳森森², 张彩勤¹, 赵勇¹, 白冰¹, 王洁¹, 师长宏^{1*}

(1. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2. 空军军医大学基础医学院, 西安 710032)

【摘要】 目的 研究人胃癌转移裸鼠模型中人 Alu 基因的表达水平与组织脏器中胃癌转移程度的相关性, 探索建立胃癌转移模型早期评估的分子生物学方法。**方法** 分别以人胃癌细胞 SGC-7901、MKN45 和正常胃黏膜细胞 GES1 基因组 DNA 为模板构建标准质粒, 通过实时荧光定量 PCR 检测不同比例胃癌细胞 SGC-7901 中 Alu 基因的表达, 获取相关性曲线; 选取胃癌细胞 SGC-7901 和 MKN45, 通过裸鼠皮下接种的方式构建人胃癌细胞异种移植转移模型, 实时荧光定量 PCR 方法检测模型鼠肝、脾、肺、肾和皮下肿瘤组织中的人 Alu 基因表达, 获得 Alu 基因的表达与各器官组织中肿瘤转移程度的相关性曲线; 将临床胃癌患者新鲜肿瘤标本皮下接种裸鼠构建异种移植模型, 进一步验证模型鼠各组织中 Alu 基因的表达与器官中肿瘤转移程度的相关性。**结果** 胃癌细胞 SGC-7901 的含量与其 Alu 基因的 Ct 值呈负相关 ($R^2=0.9239$); 人胃癌细胞异种移植 (CDX) 裸鼠转移模型中, 人 Alu 基因的表达在皮下肿瘤中处于较高水平, 在肺转移瘤和肝转移瘤中的表达则介于正常裸鼠与皮下肿瘤之间, 与组织病理学检查结果相符; 胃癌病人肿瘤异种移植 (PDX) 模型中, 已确定发生转移的脏器中虽未形成肉眼可见的转移灶, 但其人 Alu 基因的表达 (Ct 值 17.86) 与正常裸鼠 (Ct 值 22.18) 差异显著 ($P<0.05$); 而对于肉眼可见的转移灶, 其人 Alu 基因的表达 (Ct 值 14.29) 则差异极显著 ($P<0.01$)。**结论** 人胃癌裸鼠转移模型中, 人 Alu 基因的表达与胃癌转移程度呈正相关, Alu 基因表达越高, 则该组织中转移的肿瘤细胞就越多, 形成的转移灶越明显。

【关键词】 实时荧光定量 PCR; Alu 基因; 胃癌转移小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 04-0440-08

Measurement of Alu gene expression by RT-PCR in the evaluation of models of gastric cancer metastasis

WU Pengpeng¹, LIU Sensen², ZHANG Caiqin¹, ZHAO Yong¹, BAI Bing¹, WANG Jie¹, SHI Changhong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China. 2. Basic Medical College, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective We aimed to characterize the relationship between the expression of the Alu gene in a model of human gastric cancer metastasis and the degree of gastric cancer metastasis in tissues and organs and establish a molecular biological method for the early evaluation of gastric cancer metastasis. **Methods** Alu gene expression plasmids were constructed from the genomic DNA of human gastric cancer cell lines SGC-7901, MKN45 and the normal gastric mucosal cell line GES1. Alu gene expression in various concentration of gastric cancer cells SGC-7901, which was widely mentioned as human gastric metastasis cell line, was measured by real-time PCR. The relationship between different Alu expression of various concentration was measured by cycle threshold (Ct) value to modelling the standard curve. A human gastric cancer cell xenograft metastasis model was established by the subcutaneous inoculation of SGC-7901 and MKN45

[基金项目] 国家自然科学基金(31772546)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(31772546).
[作者简介] 吴朋朋(1987—), 男, 硕士, 研究方向: 人源化动物模型的制备与应用。Email: wpp217@163.com
[通信作者] 师长宏(1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn

cells into nude mice. The expression of Alu in the resulting tumors in the mice (in the liver, spleen, lung, kidney, and subcutaneous tissues) was then measured by real-time PCR, and a curve for the relationship between the expression of Alu and the degree of tumor metastasis in each tissue was constructed. Subsequently, fresh tumor samples from patients with gastric cancer were subcutaneously inoculated into nude mice to construct a xenograft model, and the relationships between Alu expression in the tissues of the mice and the degree of tumor metastasis in the organs of nude mice was similarly evaluated. **Results** The number of SGC-7901 cells negatively correlated with the cycle threshold (Ct) value for the Alu gene ($R^2 = 0.9239$). In the xenograft metastasis model, the expression of the Alu gene was higher in subcutaneous tumors than that in lung and liver metastases, and the expression of the Alu gene in lung and liver metastases was higher than normal nude mice. This was consistent with the result of histopathological examination. In the gastric cancer patient xenograft model, if there was no visible metastasis in the organs of nude mice, the expression of Alu gene (Ct 17.86) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of normal nude mice (Ct 22.18), and if there were metastatic lesions that were visible through the naked eye, the expression of Alu (Ct 14.29) was very significantly higher than that of normal nude mice ($P < 0.01$). **Conclusions** In a model of human gastric cancer metastasis, the expression of the Alu gene positively correlates with the degree of metastasis, namely the higher expression of Alu, the more metastatic tumor cells were present and the more obvious the metastatic foci were in each tissue.

【Keywords】 Real-time PCR; Alu gene; gastric cancer metastasis mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Alu 家族是一种仅存在于灵长类基因组中的散布重复序列,可用于检测各种遗传改变^[1]。1989 年, Nelson 等^[2]首先提出 Alu-PCR 技术,用于不同种属的遗传多态性分析(Alu 重复序列之间碱基序列的插入,缺失,易位和引发位点的突变等),且能够显示个体间的差异。Alu-PCR 是一种非常敏感的检测方法,能够从大量鼠类组织样品中准确灵敏地检测出人的肿瘤细胞,甚至可以从石蜡包埋组织切片提取的 DNA 中检测出 Alu 重复序列^[3],从而量化肿瘤细胞^[4]。Schneider 等^[5]采用了更加灵敏的实时荧光定量 PCR 方法,重新设计了针对人 Alu 序列的特异性定量引物,发现可以从相当于 1×10^6 个小鼠细胞中检测出一个人类肿瘤细胞,适合于扩增不同肿瘤细胞中的 Alu 序列。这说明 Alu 序列的物种特异性和高度重复性可用于人类基因组 DNA 的敏感定量分析。

胃癌(gastric cancer, GC)是全世界最常见的恶性肿瘤,在中国癌症致死的相关病例中,胃癌排在首位^[6]。尽管胃癌在手术和其他辅助治疗上取得了不错的进展,其侵袭和易转移的特性使得多数患者诊时就已达到中晚期,甚至出现远端转移,极大的影响了治疗效果,使患者的生存质量降低。胃癌早期转移的发生无法预测,且胃癌转移标本采集困难,仅仅依据临床表现、手术及用药效果来评价胃癌预后已很难满足治疗肿瘤的需求^[7-8]。

胃癌的异种移植模型能够模拟人胃癌在体内的发生、发展及转移等一系列生物学特性,是研究

胃癌的一个重要工具^[9]。本课题组前期将临床胃癌患者新鲜的手术标本移植到裸鼠体内成功建立了人胃癌裸鼠转移模型(patient derived xenograft, PDX),不仅形成移植瘤,而且成功检测到了肝转移和肺转移病灶,该模型为临床胃癌的转移研究提供了有效的个体化转移模型^[10]。由于 Alu 序列特异性存在于人类组织中,当小鼠组织中有肿瘤细胞所形成的转移灶,则可通过 RT-PCR 检测人 Alu 基因序列的表达来评估肿瘤在小鼠组织脏器的转移程度^[11]。因此,本研究通过设计人 Alu 基因特异性引物,经 RT-PCR 检测不同胃癌裸鼠转移模型各组织人 Alu 基因的表达,分析其与裸鼠各组织胃癌细胞转移程度的关系,为评估胃癌转移模型中各组织胃癌转移瘤的转移程度,以及胃癌转移动物模型的评估提供有效的分子生物学方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级雄性裸鼠,体重 22 ~ 25 g,购自北京维通利华生物技术有限公司【SCXK(京)2016-0011】,饲养在中国人民解放军空军军医大学实验动物中心屏障设施内【SYXK(陕)2019-001】。环境温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,12 h 光照/12 h 黑暗,饲料经辐照处理,饮用水经高压灭菌处理,实验鼠自由摄食和饮水。动物实验通过了空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批

准(审批号:20180512)。

1.1.2 细胞及肿瘤样本

人胃癌细胞 SGC-7901、MKN45 及人正常胃黏膜细胞 GES1 购买于国家实验细胞资源共享平台,小鼠成纤维细胞(L929)为本实验室保存。细胞培养条件为 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清 + 1%青链霉素),37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

临床胃癌标本来自空军军医大学西京消化病医院,肿瘤标本的取得经过患者本人及家属同意,并签署知情同意书,相应实验通过西京医院医学伦理委员会的批准(审批号:2015432)。

1.1.3 主要试剂与仪器

基质胶(Matrigel Matrix)由美国 BD 公司生产;异氟烷购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;RPMI-1640 培养基和 0.05%胰酶购自美国 HyClone 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;苏木精和伊红染色液购自北京 Leagene 生物技术有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒购买于北京天根生化科技有限公司;荧光定量 PCR 及质粒构建等分子生物相关试剂均购自大连宝生物工程有限公司。酶标仪(Biotek Take,美国);基因扩增仪(eppendorf,德国);荧光定量 PCR 仪(StepOne Plus, Thermo Fisher,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 Alu 基因扩增及标准质粒的构建

根据 NCBI 人类基因组 DNA 中的 Alu 基因(XR_948994)序列以及相关文献^[12-13],设计并合成特异性引物(表 1),提取人胃癌细胞 SGC-7901、MKN45 和正常胃黏膜细胞 GES1 基因组 DNA,按 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 操作说明,PCR 扩增 Alu 基因(Alu865 引物)。琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后,用 DNA 回收试剂盒回收目的基因(865 bp)并克隆至 pMD19-T 载体中,连接产物转化至 E. coli Competent Cell JM109。转化菌提取质粒经酶切鉴定正确后,由宝生物工程(大连)有限公司用

pMD18-R 测序引物进行测序。

1.2.2 绘制 Alu 基因表达标准曲线

将 Alu 基因标准质粒梯度稀释为不同浓度(50、10、2、0.4、0.08、0.016、0.0032 ng/μL),去离子水为阴性对照组(NTC),按 SYBR® Premix Ex Taq™ II 操作说明进行 Alu 基因的定量检测(Alu 引物)。每组样本检测 3 次,每次检测均做 3 个复孔,最终 Ct 值以平均数表示(以下 Ct 值均相同),根据拷贝数计算公式计算待测样本中 Alu 基因的拷贝数^[14]。

Alu 基因拷贝数(copies/μL)=[质粒浓度(ng/μL)×1 μL]×10⁻⁹×(6.02×10²³ copies/mol)/[(质粒分子量+插入片段分子量)×660]

1.2.3 不同比例胃癌肿瘤细胞(SGC-7901)中 Alu 基因的检测

在小鼠成纤维细胞(L929)悬液中混合胃癌肿瘤细胞(SGC-7901),使得 L929 细胞中 SGC-7901 细胞的百分比分别达到 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%。提取各组的基因组 DNA,测定每组 Alu 基因的 Ct 值并绘制标准曲线。

1.2.4 胃癌裸鼠转移模型的制备及人 Alu 基因的检测

选取 SGC-7901 和 MKN45 胃癌细胞,分别用无菌 PBS 将细胞稀释成 1×10⁷/0.2 mL 细胞悬液接种到 10 只 6~8 周龄的裸鼠皮下,继续饲养观察。每周测量 1 次肿瘤体积,肿瘤体积计算公式采用 $V=1/2 \times l \times w^2$,其中 l 为肿瘤最长直径, w 为肿瘤最短直径。肿瘤生长至约 1000 mm³,将模型鼠安乐死后采集每只裸鼠的肝、脾、肺、肾和皮下肿瘤组织,取部分样本用 4%多聚甲醛固定,用于病理切片染色观察和肿瘤相关标志物免疫组化检测;部分样本提取基因组 DNA 进行人 Alu 基因的测定。

1.2.5 Alu 基因检测评估人胃癌病人异种移植模型转移趋势

将采集的 3 例临床胃癌患者新鲜肿瘤标本(C26284、C72448 和 C61262)用剪刀修整为直径

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of the primer sequences			
引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	片段长度(bp) Product length(bp)	退火温度(℃) Tm(℃)
Alu865	F:ATTAGATGAGGTAGGATTGCTTC R:CCCTTGCTGACTTGACTAAGAAAT	865	55
Alu	F:CATGGTGAACCCCGTCTCTA R:GCCTCAGCCTCCCGAGTAG	92	60

1 mm左右的组织块,与基质胶 1 : 1 混匀后用套管针注射于 6 ~ 8 周龄的裸鼠皮下,伤口消毒后继续饲养观察。同时裸鼠尾静脉注射胃癌细胞(SGC-7901)作为胃癌转移模型阳性对照组,正常裸鼠作为阴性对照组。待肿瘤生长至 1000 mm³ 后,模型鼠进行安乐死,采集裸鼠肝、脾、肺、肾和皮下肿瘤,取部分样本组织用 4% 多聚甲醛固定,用于病理切片染色观察;部分组织提取基因组 DNA,用于人 Alu 基因的检测分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。各组数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有显著性,*P* < 0.01为差异极具有显著性。

2 结果

2.1 Alu 基因扩增及标准质粒的构建

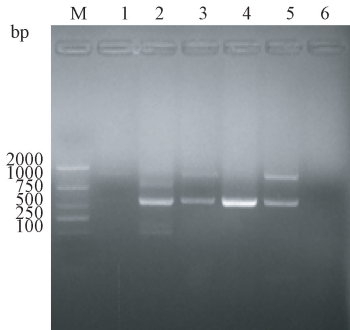
以人胃癌细胞基因组 DNA 为模板构建的 Alu 基因标准质粒,经 PCR 鉴定和 Alu 基因序列测序,结果与 NCBI 的 Alu 序列完全相符(见图 1),说明了本研究设计的 Alu 引物具有较好的特异性且 Alu 基因广泛存在于人胃癌细胞及肿瘤组织中。

2.2 Alu 基因标准曲线的绘制

实时定量 PCR 检测不同浓度质粒 Alu 基因的 Ct 值绘制标准曲线,并根据拷贝数计算公式计算待测样本中 Alu 基因的拷贝数。结果显示,Alu 基因的 Ct 值与其拷贝数呈负线性相关(*R*²=0.9979),即 Alu 基因的 Ct 值越低,其拷贝数越高(见图 2、表 2)。

2.3 不同比例胃癌细胞(SGC-7901)中 Alu 基因的检测

梯度调整小鼠成纤维细胞(L929)悬液中胃癌细胞(SGC-7901)的百分比,测定每组人 Alu 基因的表达情况并绘制标准曲线。结果显示(图 3、表 3) Alu 基因的 Ct 值与胃癌细胞(SGC-7901)的百分比



注:M;DL2000 DNA Marker;1:小鼠基因组 DNA;2:SGC-7901;3: MKN45;4:GES1;5:胃癌病人肿瘤组织 DNA;6:阴性对照。

图1 各细胞系中 Alu 基因的扩增

Note. M. DL2000 DNA Marker. 1. Genomic DNA of mouse. 2. SGC-7901. 3. MKN45. 4. GES1. 5. Genomic DNA of gastric cancer tumors. 6. Negative control.

Figure 1 PCR amplification of Alu gene in the gastric cancer cell lines

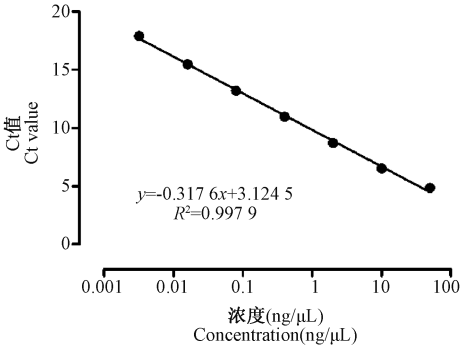


图2 Alu 基因标准曲线

Figure 2 Standard curve of Alu

呈负相关(*R*²=0.9239),即细胞混合液中胃癌细胞含量越低,Alu 基因的拷贝数越低,Alu 基因的 Ct 值越高。

2.4 人胃癌异种移植转移模型的构建及 Alu 基因的检测

将胃癌细胞(SGC-7901 和 MKN45)构建的 CDX 模型鼠安乐死并解剖观察,结果发现荷瘤鼠除

表 2 不同浓度标准质粒 Alu 基因的表达

Table 2 Alu gene expression in different concentration of Alu plasmids

质粒浓度(ng/μL) Concentration(ng/μL)	拷贝数(log10 copies/μL) Copies(log10 copies/μL)	Ct 平均值 Ct average value	Ct 1	Ct 2	Ct 3
50	17.44	4.84 ± 0.10	4.88	4.92	4.73
10	16.74	6.53 ± 0.05	6.49	6.53	6.58
2	16.04	8.72 ± 0.02	8.71	8.71	8.75
0.4	15.35	10.97 ± 0.15	10.91	11.14	10.85
0.08	14.65	13.20 ± 0.12	13.13	13.33	13.13
0.016	13.95	15.48 ± 0.03	15.47	15.51	15.45
0.0032	13.25	17.89 ± 0.09	17.86	17.83	17.99
阴性对照 Negative control	/	26.08 ± 0.26	25.80	26.13	26.32

皮下形成明显的肿瘤外,肉眼可看到部分裸鼠在肝、肺部有肿瘤转移灶(图 4 MKN45 和 SGC-7901 细胞模型组左侧图)。用临床获得的新鲜胃癌手术标本构建的 PDX 模型(C26284、C72448 和 C61262)也发现了肺和肝部转移灶(图 4 C26284、C72448 和 C61262 病人肿瘤模型组左侧图)。HE 染色观察(图 4 各模型组右侧图)可见肺和肝组织中有明显的肿瘤侵入形态结构,肿瘤组织腺体生长丰富,肿瘤细胞处于增殖旺盛阶段,符合胃腺癌的特征。病理结果均显示裸鼠组织中出现的转移灶与原发肿瘤保持了相同的组织结构。

进一步检测胃癌细胞(SGC-7901 和 MKN45)构建的 CDX 模型鼠肝、脾、肺、肾及皮下肿瘤组织中的人 Alu 基因表达,正常未接种肿瘤的裸鼠作为阴性对照(表 4)。结果显示 SGC-7901 组人 Alu 基因

高表达主要发生在肺(Ct 值 13.88);MKN45 组则主要发生在肝(Ct 值 13.21)和肺(Ct 值 16.61),而其他组织脏器人 Alu 基因 Ct 值均大于 17(脾,Ct 值 17.86;肾,Ct 值 17.93),这与组织学检查和解剖观察的脏器转移结果相符。

将各样本按器官来源重新分组,结果显示(图 5):胃癌细胞 Alu 基因的 Ct 值为 4.56 ~ 8.50;皮下肿瘤为 7.21 ~ 9.92;肺转移瘤为 13.88 ~ 17.93;肝转移瘤为 12.61 ~ 17.86;裸鼠各脏器组织 Ct 值为 20.67 ~ 23.66;阴性对照为 26.66 ~ 27.66。说明人 Alu 基因的表达在胃癌细胞和肿瘤细胞丰富的皮下肿瘤中处于较高水平;在正常裸鼠各脏器组织中表达最低;发生肿瘤转移的肺和肝中人 Alu 基因的表达则介于正常裸鼠与皮下肿瘤之间,这也与组织病理学检查结果相符。

2.5 人 Alu 基因检测评估胃癌病人异种移植模型转移趋势

收集胃癌病人异种移植模型鼠的肝、脾、肺、肾及皮下肿瘤组织并检测人 Alu 基因的表达,结果显示(表 5、图 6):SGC-7901 组转移主要发生在肺(Ct 值 11.85);C61262 组转移主要发生在肝(Ct 值 13.88)和肺(Ct 值 14.28);C26284 组转移主要发生在肺(Ct 值 15.74);C72448 组转移主要发生在肝(Ct 值 13.02)和肾(Ct 值 13.69),这与组织学检查和解剖观察发现肿瘤转移主要发生在肝和肺部结果相符。

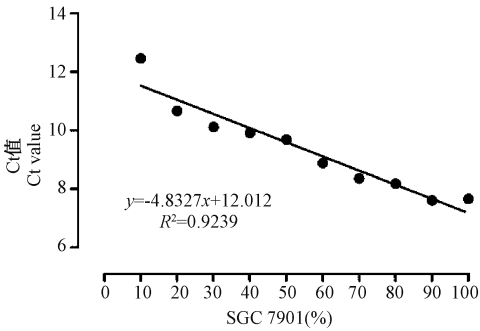


图 3 SGC-7901 细胞 Alu 基因表达标准曲线
Figure 3 Standard curve of Alu in SGC-7901

表 3 不同浓度 SGC-7901 细胞中 Alu 基因的表达

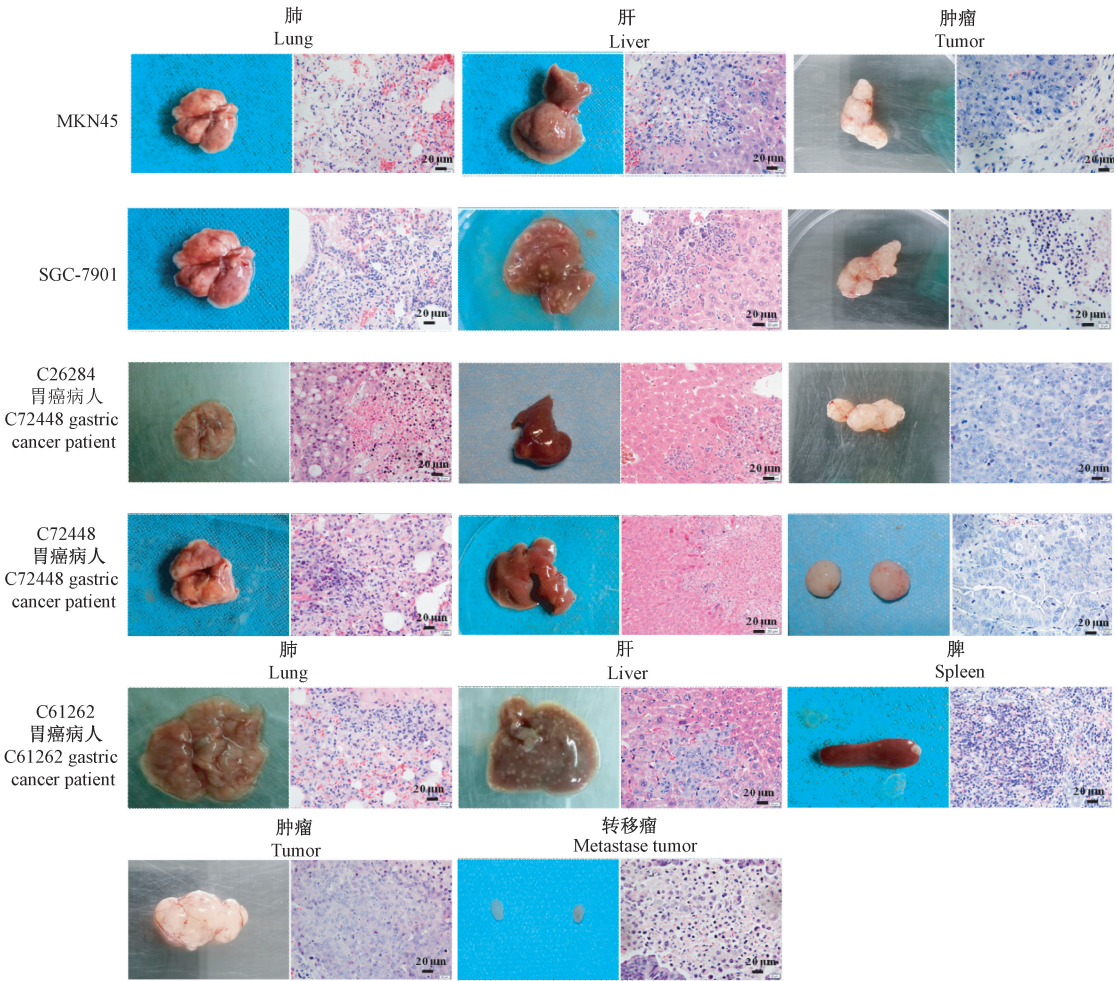
Table 3 Expression of Alu in different concentrations of SGC-7901

组别 Groups	SGC-7901 (%)	L929 (%)	Ct 平均值 Ct average value	Ct 1	Ct 2	Ct 3
0	0	100	21.46 ± 0.01	21.45	21.47	21.45
1	10	90	12.45 ± 0.07	12.53	12.43	12.40
2	20	80	10.67 ± 0.22	10.55	10.93	10.54
3	30	70	10.12 ± 0.26	10.41	10.04	9.90
4	40	60	9.92 ± 0.06	9.97	9.93	9.85
5	50	50	9.69 ± 0.25	9.73	9.91	9.42
6	60	40	8.88 ± 0.14	8.94	8.72	8.99
7	70	30	8.36 ± 0.09	8.39	8.26	8.43
8	80	20	8.18 ± 0.03	8.21	8.16	8.17
9	90	10	7.61 ± 0.10	7.59	7.72	7.52
10	100	0	7.66 ± 0.09	7.60	7.76	7.62

表 4 不同小鼠器官人 Alu 基因的表达

Table 4 Expression of Alu gene in different mice organs

荷瘤鼠 Tumor-bearing mice	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	皮下肿瘤 Subcutaneous tumor
裸鼠 Nude mice	22.89 ± 0.03	21.31 ± 0.23	21.80 ± 0.08	22.16 ± 0.10	/
7901 荷瘤小鼠 7901 tumor-bearing mice	16.57 ± 0.08	17.86 ± 0.28	13.88 ± 0.03	17.93 ± 0.09	9.92 ± 1.30
MKN45 荷瘤小鼠 MKN45 tumor-bearing mice	13.21 ± 0.05	19.06 ± 0.08	16.61 ± 0.05	19.41 ± 0.06	7.21 ± 0.07



注：每组图左侧为转移瘤形态，右侧为转移器官组织 HE 染色结果。

图 4 胃癌小鼠模型转移瘤的形态和组织结构

Note. Left side of each group is the metastatic tumor morphology, right side is the HE staining result of metastatic organ tissue.

Figure 4 Morphology and tissue structure of metastatic tumor

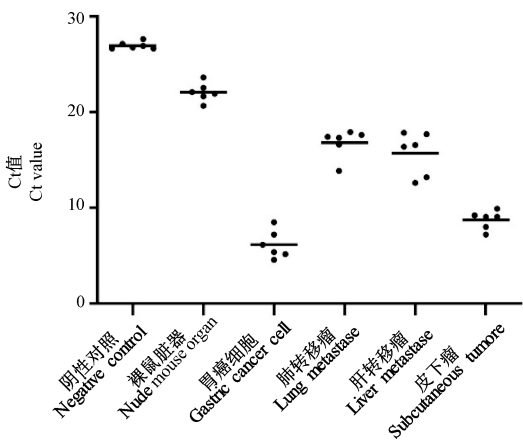


图 5 不同组织样本人 Alu 基因的表达

Figure 5 Expression of Alu gene in different sources tissues

选取组织学检查中已经明确发现胃癌转移细胞的组织样本 (HE 染色和胃癌肿瘤相关标志物 CEA、CA19-9 均为阳性), 按照解剖中能否发现转

移灶重新分组,结果显示 (见图 7): 相比于皮下肿瘤组织 (Ct 值 9.29), 未形成转移灶的组织 (Ct 值 17.86) 与健康裸鼠组织 (Ct 值 22.18) 差异显著 ($P < 0.05$), 而形成转移灶的组织 (Ct 值 14.29) 差异极显著 ($P < 0.01$)。进一步说明了人 Alu 基因的表达与胃癌转移模型各组织胃癌转移程度呈正相关, Alu 基因表达越高 (Ct 值越低), 该组织中转移的肿瘤细胞就越多, 形成的肿瘤转移灶越明显。

3 讨论

本课题组先后用人胃癌细胞 SGC-7901 和 MKN45 建立了细胞系移植 (CDX) 模型, 用胃癌临床手术标本获得的 3 例 PDX 模型 (C26284、C72448 和 C61262), 经过多次传代筛选后该模型发生了肺部和肝部转移, 转移灶病理切片的 HE 染色确定符合胃腺癌的特征。

表 5 胃癌转移小鼠各器官人 Alu 基因的表达

Table 5 Expression of Alu gene in gastric cancer metastatic mice organs

荷瘤鼠 Tumor-bearing mice	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	皮下肿瘤 Subcutaneous tumor
裸鼠 Nude mice	22.11 ± 0.03	21.95 ± 0.23	21.94 ± 0.08	21.76 ± 0.10	/
7901 荷瘤小鼠 7901 tumor-bearing mice	18.84 ± 0.09	20.35 ± 0.12	11.85 ± 0.19	15.72 ± 0.30	/
C61262 荷瘤小鼠 C61262 tumor-bearing mice	13.88 ± 0.01	17.65 ± 0.17	14.28 ± 0.46	18.68 ± 0.06	6.17 ± 0.46
C26284 荷瘤小鼠 C26284 tumor-bearing mice	15.74 ± 0.03	15.17 ± 0.21	13.41 ± 0.17	16.52 ± 0.12	8.26 ± 0.24
C72448 荷瘤小鼠 C72448 tumor-bearing mice	13.02 ± 0.09	20.25 ± 0.28	16.08 ± 0.14	13.69 ± 0.20	8.41 ± 0.21

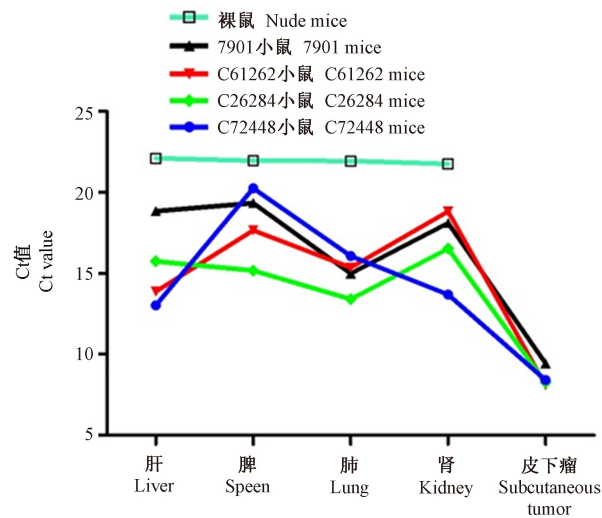


图 6 不同胃癌转移模型小鼠组织中 Alu 基因的表达

Figure 6 Expression of Alu gene in gastric cancer metastatic mice organs

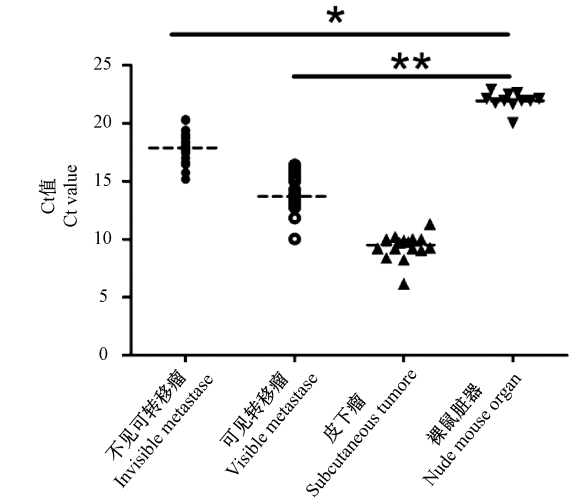


图 7 不同转移程度组织样本 Alu 基因的表达

Figure 7 Expression of Alu gene in different metastasis tissues

Funakoshi 等^[15]开发了一种基于 Alu 的高灵敏度和特异性的实时 PCR 方法,用于区分人类细胞和

啮齿动物细胞,可以从 100 ng 的人类和啮齿动物混合基因组 DNA 中检测到 1 个 fg 的人 Alu 基因,相当于 1 亿个啮齿动物细胞中有 1 个人类细胞。而 Schneider 等^[5]也发现在人类异种移植的 10⁶ 个小鼠血细胞中可以很容易地检测到一个人类癌细胞。Nehmann 等^[16]在比较了 Alu 实时定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 和激光扫描细胞术 (LSC) 两种方法检测小鼠外周血中人 HT29 结肠癌细胞的有效性时发现,无论加入多少癌细胞,使用 qRT-PCR 在所有样本中都能正确地检测出小鼠血液中几乎 100% 的人类癌细胞数量,也进一步确认了通过 PCR 检测人 Alu 基因的表达来直接监测转移部位的肿瘤负荷的可行性。

本研究就是在 Schneider 等^[5]方法的基础上,重新设计人 Alu 基因特异性引物序列,通过实时定量 PCR 特异性检测胃癌裸鼠转移模型各组织中 Alu 基因的表达。为了确定精确测定 Alu 基因的拷贝数,以人胃癌细胞基因组 DNA 为模板构建了 Alu 基因标准质粒,RT-PCR 检测后发现 Alu 基因的拷贝数随着各组中标准质粒浓度的增加而增加 ($R^2 = 0.99$),即 Alu 基因的 Ct 值越低,其拷贝数则越高。同时,随着小鼠成纤维细胞 (L929) 中胃癌肿瘤细胞 (SGC-7901) 含量的增加人 Alu 基因的表达也呈逐步上升的现象 ($R^2 = 0.92$),这与 Zubair 等^[17]在小鼠的脾、肺和肝中检测到注射的人淋巴瘤细胞的研究结果相符。也说明了细胞混合液中胃癌细胞含量越低,人 Alu 基因的拷贝数也越低。

在建立的人胃癌细胞异种移植转移模型鼠 (SGC-7901 和 MKN45) 各个脏器中,人 Alu 基因在胃癌细胞 (Ct 值为 4.56 ~ 8.50) 和肿瘤细胞丰富的皮下肿瘤 (Ct 值为 7.21 ~ 9.92) 均处于较高的表达水平,在正常裸鼠各脏器组织中表达最低;而在肺转移瘤 (Ct 值为 13.88 ~ 17.93) 和肝转移瘤 (Ct 值为 12.61 ~ 17.86) 中人 Alu 基因表达则处于正常裸

鼠和皮下肿瘤两者之间,不仅与组织学检查(HE 染色)结果相符,而且与 Schneider 等^[5]发现“在携带肿瘤的小鼠中,Alu 信号随着时间的推移在转移器官中逐步增加,且在高转移的肿瘤细胞中,这种增加更为明显”的结果相一致。

通过 PDX 模型进一步确认了上述规律,而且发现病理学分析已明确发生转移的组织样本中,虽然未形成肉眼可见转移灶,但其 Ct 值(17.86)与正常裸鼠组织 Ct 值(22.18)具有显著差异性($P < 0.05$),而肉眼可见的转移灶中 Ct 值(均值为 14.29),则差异极具显著性($P < 0.01$)。这说明在准确判定转移的前提下(与组织学检查结果一致),该方法不仅能够检测肿瘤细胞丰富的组织样本(皮下肿瘤组织,肉眼可见转移灶的组织),也能够有效的从发生转移的组织中区分早期转移的肿瘤细胞,进一步验证了该方法具有极高的灵敏度,也证明了人 Alu 基因的表达与转移部位的肿瘤负荷呈线性相关。这也与 Lange 等^[18]在 PDX 肿瘤传代中发现随着时间的推移,检测到小鼠血液、肺和肝中肿瘤细胞的数量与转移进展直接相关,但在骨髓或脑中观察不到这种相关性的结果相一致。当然,由于目前基于临床胃癌病人的 PDX 转移模型数量有限,还不能精确确定胃癌转移模型鼠发生肿瘤转移的组织与未发生转移组织人 Alu 基因的 Ct 值界限,本实验室将会深入细致研究人 Alu 基因检测在胃癌转移模型转移程度预测中的应用。

综上所述,通过荧光定量 PCR 检测了人胃癌裸鼠转移模型中各组织人 Alu 基因的表达,结果发现人 Alu 基因表达越高,组织中转移的胃癌肿瘤细胞越多,转移灶越明显。本研究为评估胃癌转移模型中各组织胃癌转移瘤的转移程度,以及胃癌转移动物模型的评估提供可靠的分子生物学参考方法。

参 考 文 献(References)

- [1] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome [J]. *Nature*, 2001, 409(6822): 860-921.
- [2] Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, et al. Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(17): 6686-6690.
- [3] Furmaga WB, Ryan JL, Coleman WB, et al. Alu profiling of primary and metastatic nonsmall cell lung cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74(3): 224-229.
- [4] Ren Y, Savill J. Apoptosis: the importance of being eaten [J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5(7): 563-568.
- [5] Schneider T, Osl F, Friess T, et al. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR - an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(7): 571-582.
- [6] Ratti M, Lampis A, Hahne JC, et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(22): 4151-4162.
- [7] 王洁, 赵菊梅, 魏晓丽, 等. 基于 PDX 模型的胃癌转移相关基因研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 663-667.
Wang J, Zhao JM, Wei XL, et al. Research of metastasis-related genes based on the patient-derived gastric cancer xenograft model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 663-667.
- [8] Kim H, Hwang Y, Sung H, et al. Effectiveness of gastric cancer screening on gastric cancer incidence and mortality in a community-based prospective cohort [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(2): 582-589.
- [9] Davies AH, Wang Y, Zoubeidi A. Patient-derived xenografts: a platform for accelerating translational research in prostate cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 462: 17-24.
- [10] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 7-12.
Wang J, Zhao NN, Zhang CQ, et al. Establishment of a nude mouse model of gastric cancer metastasis model derived from clinical tumor specimens [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(1): 7-12.
- [11] Rhyu MG, Oh JH, Hong SJ. Species-specific role of gene-adjacent retroelements in human and mouse gastric carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(8): 1520-1527.
- [12] Kariya Y, Kato K, Hayashizaki Y, et al. Revision of consensus sequence of human Alu repeats - a review [J]. *Gene*, 1987, 53(1): 1-10.
- [13] Arcot SS, Shaikh TH, Kim J, et al. Sequence diversity and chromosomal distribution of 'young' Alu repeats [J]. *Gene*, 1995, 163(2): 273-278.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, et al. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13202.
- [16] Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, et al. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC) [J]. *Acta Histochemica*, 2010, 112(5): 489-496.
- [17] Zubair AC, Ali SA, Rees RC, et al. Investigation of the effect of BB-94 (batimastat) on the colonization potential of human lymphoma cells in SCID mice [J]. *Cancer Lett*, 1996, 107(1): 91-95.
- [18] Lange T, Oh-Hohenhorst SJ, Joosse SA, et al. Development and characterization of a spontaneously metastatic patient-derived xenograft model of human prostate cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17535.