

# 外周血 DNA 和 hTERT 在肺癌诊断中的应用

王京,吕可洁,朱广昌

Application of Serum DNA and hTERT in Diagnosis of Lung Cancer

WAN GJing, LV Ke-jie, ZHU Guang-chang

Department of Thoracic Surgery, Beijing Friendship Hospital Affiliated of the Capital University of Medicine Sciences, Beijing 100050, China

**Abstract :Objective** This study designed to assess a quantitative molecular assay of serum DNA and the expression of hTERT in patients with lung cancers to explore a novel noninvasive approach, elevating the sensitivity and specificity in diagnosis of lung cancer. We conducted the clinical study to provide a new marker for earlier lung cancer detection. **Methods** Forty-one informed patients with lung cancers and 22 healthy persons were included as control. DNA was extracted from serum samples with Magazorb DNA Mini-Prep Kit and quantified, then hTERT sequences were amplified by nested PCR using gene primers. **Results** Mean concentration of serum DNA between patients with lung cancers and healthy persons was 33.464 μg/ml and 18.420 μg/ml respectively. Concentration of free circulation DNA in patients with lung cancers was higher than the other group ( $P < 0.01$ ). The area under the ROC curve by ratio of gray scale was 0.852 (95% CI, 0.750 to 0.953). Amplification of serum hTERT by nested PCR was an approach with moderate veracity to detect lung cancers. Meanwhile, it had a good coherence with pathology ( $Kappa = 0.477, P < 0.01$ ). **Conclusion** The level of free circulating DNA in patients with lung cancers was higher than healthy persons. Amplification of serum hTERT by nested PCR was an approach with high sensitivity. So it may be a new, noninvasive approach for early detection of lung cancers.

**Key words:** Lung cancer; DNA; hTERT; Gene diagnosis

**摘要:** 目的 检测肺癌患者血清 DNA 含量及 hTERT 的表达水平,寻求微创、高敏感性及特异性的检测方法,为肺癌早期诊断提供新指标。方法 41 例病理证实肺癌患者,22 例正常人设为对照组。磁珠悬浮法提取测定血清 DNA 含量;巢式 PCR 法扩增血清 hTERT 片段,测定灰度比。结果 肺癌患者、正常人血清 DNA 含量均数分别为 33.464 和 18.420,肺癌组血清 DNA 浓度显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。巢式 PCR 法扩增血清 hTERT 片段,测定灰度比作为诊断分界点,绘制 ROC 曲线,  $A_Z = 0.852$ ,  $A_Z$  的 95% 置信区间为  $CI(0.750, 0.953, P = 0.000)$ ,因此可以认为血清 hTERT 对于肺癌的诊断具有中等准确性。诊断分界点 = 0.4 时,其  $Kappa = 0.477$ ,( $P < 0.01$ ),有统计学意义,其与病理诊断的一致性较好。结论 外周血 DNA 和 hTERT 在肺癌诊断中具有较好的敏感性和特异性,可能成为肺癌早期诊断的新检测手段。

**关键词:** 肺癌;DNA;hTERT;基因诊断

中图分类号:R392.11;R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)09-0656-03

## 0 引言

研究表明恶性肿瘤患者循环血中 DNA 水平不仅远远高于正常人,而且还具有肿瘤特征性的 DNA 改变,并和肿瘤组织中表达的同一基因一致<sup>[1]</sup>。端粒酶在永生化细胞系及恶性肿瘤衍生的细胞株中表达均为阳性,在正常细胞中不表达<sup>[2]</sup>。通过对肺癌患者外周血 DNA 的提取分析,巢式 PCR 法扩增血清 hTERT(人类端粒酶逆转录酶),研究其表达水

平,将为肺癌的早期诊断提供重要线索,并将可能为肺癌的治疗、术后监测及预后的判断提供重要依据。为此,我们检测了肺癌患者外周血 DNA 水平及 hTERT 浓度,以探讨外周血 DNA 及 hTERT 浓度检测对肺癌的诊断价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择胸外科 2005 年经细胞学或病理学检查证实首次治疗的肺癌患者 41 例;其中腺癌 19 例,鳞癌 15 例,鳞腺癌 2 例,小细胞癌 3 例,大细胞癌 2 例;男性 17 例,女性 24 例;年龄 18~75 岁,平均年龄 59 岁;按世界卫生组织(WHO)肿瘤分期标准:Ⅰ期 14 例、Ⅱ期 18 例、Ⅲ期 9 例。并随机选择健康体

收稿日期:2007-09-10;修回日期:2008-01-21

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院胸外科

作者简介:王京(1966~),男,本科,副主任医师,主要从事胸部肿瘤外科诊治的临床及科研工作

检者 22 例进行对照。所有对象外周血白细胞、肝肾功能正常,无慢性肝炎和自身免疫系统疾病。

## 1.2 方法

1.2.1 实验试剂 (1) 琼脂糖、TaqDNA 聚合酶; (2) 试剂盒:磁珠纯化 DNA 试剂盒(BSCOSS<sub>2</sub>),北京佰亿新创科技有限公司;TaqPCR 试剂盒(KT101-01),北京天为时代公司;DNA Marker1(MD101-01),北京天为时代公司;PCR 引物,北京赛百盛基因技术有限公司;(3) PCR 引物设计与合成:hTERT 碱基序列定位于 5p 15.33,外重引物 343 bp(2 647 ~ 2 989),内重引物 326 bp(2 662 ~ 2 989, GenBank assessment number AF015950),应用 Primer3 分析软件进行设计,北京赛百盛基因技术有限公司。

hTERT-up(P1): 5'-GCGTTGGTGGATGA TTTCT-3'

hTERT-down(P2): 5'-CAA GACCCAAA GA GTTTCG-3'

hTERT-up(P3): 5'-TTTCTTGTGGTGACACCTC-3'

hTERT-down(P4): 5'-CAA GACCCAAA GA GTTTCG-3'

1.2.2 主要设备 DNA Thermal Cycler,美国 Perkin Elmer Cetus 公司;紫外凝胶成像仪 ChemiDoc,意大利 Bio-RAD;紫外可见分光光度计 Ultron-Spec3100,英国 Biochrom Ltd;台式低温离心机,上海安亭科学仪器厂;低温冰箱 UL T1386-3-V30,美国 REVCO 公司;电泳仪 EPS300,上海天能科技有限公司。

1.2.3 实验方法 (1) 血清 DNA 的提取及浓度测定。抽取实验对象 3 ml 血标本置入红管离心处理(如不能及时处理,可存放 4℃ 冰箱不超过 6 小时)——取离心后上层血清置入 1.5 ml 离心管,-80℃ 保存;血清标本、Magazorb DNA Mini-Prep Kit 试剂室温化,取 12 μl PK(蛋白酶)置入 1.5 ml 微量离心管,取 120 μl 血清移至上管,并移入 120 μl Lysis Buffer,混匀 15 秒,56℃ 温浴 10 min;加 300 μl Binding Buffer 至上管,加入 12 μl 混匀的 Magazorb 试剂,充分混匀,室温温浴 10 min,将微量离心管放于磁力架上,吸附已结合 DNA 的磁珠,弃上清液备用;加 600 μl Wash Buffer 至上述微量离心管充分混匀后放于磁力架上,吸附磁珠,弃上清液,重复洗涤 1 次;加 20 μl Elution Buffer 至上述微量离心管充分混匀 10 min 后放于磁力架上,吸附磁珠,仔细将上清液移入干净微量离心管,-20℃ 保存备用;2.5 μl DNA 产物溶于 500 μl 去离子水中,稀释 200 倍,取 90 μl 去离子水入比色皿作为对照,放入紫外可见光分光光度计比色架进行标准化;擦净比色皿,移入 90 μl 稀释后的 DNA 产物,测定浓度并记录数值。每个样本测定 3 次,取中间值,DNA 浓度

(μg/ml)=测定 DNA 浓度/6;(2) 巢式 PCR 扩增 hTERT。第一次扩增,PCR 扩增体系(25 μl):10×Reaction Buffer 2.5 μl;dNTP Mixture(2.5 mmol/l each)2 μl;Taq(2.5 u/μl)0.35 μl;GAPDH-up(10 μmol/l)1 μl;GAPDH-down(10 μmol/l)1 μl;DNA 产物 2 μl;ddH<sub>2</sub>O 16.15 μl

反应体系加石蜡油 20 μl。

反应条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s;52℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1 min;20 个循环后 72℃ 延伸 10 min

第一次扩增产物稀释 100 倍,取 4 μl 用于第二次扩增。

第二次扩增,PCR 扩增体系(25 μl):10×Reaction Buffer 2.5 μl;dNTP Mixture(2.5 mmol/l each)2 μl;Taq(2.5 u/μl)0.3 μl;GAPDH-up(10 μmol/l)1 μl;GAPDH-down(10 μmol/l)1 μl;第一次扩增产物(1%)4 μl;ddH<sub>2</sub>O 14.2 μl

反应体系加石蜡油 20 μl。反应条件:预变性、94℃、3 min;变性、94℃、30 s;退火、52℃、1 min;延伸、72℃、1 min;26 个循环后 72℃ 延伸 10 min

反应结束,取 7 μl PCR 产物在 1.25% 的琼脂糖凝胶(含 0.5% 溴化乙啶)电泳,紫外灯观察,紫外凝胶成像仪扫描成像。每次均设阳性及阴性对照。成像照片应用图像分析处理系统进行灰度扫描,分析测定面积的积分光密度值。

## 1.3 统计学方法

结果经 SPSS 11.5 统计分析软件进行分析处理,计量资料采用均数 ± 标准差描述,单因素方差分析;计数资料采用构成比描述,卡方检验。建立 ROC 曲线(受试者工作特征曲线),计算曲线下面积,两者一致性比较采用 Kappa 检验方法,P < 0.01 差异有统计学意义,0.01 < P ≤ 0.05 差异有统计学意义,P > 0.05 差异无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DNA 含量测定

实验提取 63 例血清标本 DNA(肺癌组 41 例,正常对照组 22 例),紫外可见分光光度计测定浓度:肺癌组均数为 33.4637 μg/ml,标准差为 9.45118,95% CI(30.48,36.45) μg/ml,双侧检验 P = 0.333 > 0.05,本组数据近似正态分布。正常对照组均数为 18.4200 μg/ml,标准差为 5.56294,95% CI(14.44,22.40) μg/ml,双侧检验 P = 0.999,本组数据近似正态分布。

两组数据经 SPSS 11.5 统计分析软件进行单因素方差分析 P < 0.01,差异有统计学意义,由此可以

认为肺癌组血清 DNA 含量显著高于正常对照组。

## 2.2 血清 hTERT 表达检测

首先通过管家基因 GAPDH 验证 DNA 质量, 使用双重引物 P1-P2、P3-P4 通过巢式 PCR 扩增 hTERT, 1.25% 琼脂糖电泳后照相。实验中用提取肺癌组织 DNA 作阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 作阴性对照, 对 63 例研究对象的血清 DNA 扩增后照片中条带进行灰度测定, 并与相应管家基因 GAPDH 扩增得到的条带灰度值相比, 得到 hTERT 灰度比值, 见表 1。

表 1 hTERT 扩增后灰度比测定结果

Tab 1 Ratio of gray scale

| Pathology | hTERT      |               |               |               |          | Total |
|-----------|------------|---------------|---------------|---------------|----------|-------|
|           | 0 ~<br>0.2 | 0.21 ~<br>0.4 | 0.41 ~<br>0.6 | 0.61 ~<br>0.8 | ><br>0.8 |       |
| Malig     | 7          | 3             | 4             | 4             | 23       | 41    |
| Normal    | 15         | 4             | 2             | 1             | 0        |       |

拆分为 2 × 2 表格, 计算出 FPR 值(假阳性率)和 TPR 值(真阳性率—敏感度)构成一对, 即为 ROC 工作点, 见表 2。

表 2 hTERT 的 ROC 工作点

Tab 2 Receiver Operating Characteristic of hTERT

| DP  | TPR     | FPR     |
|-----|---------|---------|
| 0.2 | 83.93 % | 31.82 % |
| 0.4 | 75.61 % | 13.64 % |
| 0.6 | 65.85 % | 4.55 %  |
| 0.8 | 56.10 % | 0.00 %  |

以 TPR 为纵轴, FPR 为横轴, 应用 SPSS11.5 统计分析软件绘制 ROC 曲线, 见图 1。

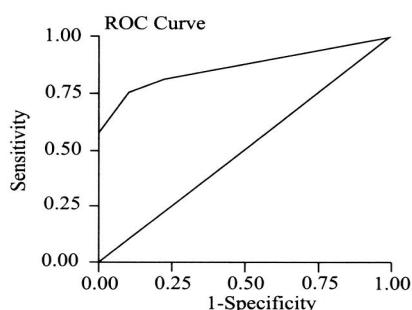


图 1 血清 TERT 诊断肺癌的 ROC 曲线

Fig 1 ROC curve for diagnosis of lung cancer

ROC 曲线下面积  $A_z = 0.852$ ,  $A_z$  的 95% 置信区间为  $CI(0.750, 0.953, P = 0.000)$ , 因此可以认为血清 hTERT 对于肺癌的诊断具有中等准确性。进一步取不同的灰度比值作为分界点, 对其诊断敏感性、特异性进行分析, 并计算其 Kappa 值。当诊断分界点为 0.2 时  $Se = 82.93\%$ ,  $Sp = 68.18\%$ ,  $Kappa = 0.456$ ; 当诊断分界点为 0.4 时  $Se = 75.61\%$ ,  $Sp$

= 86.36%,  $Kappa = 0.477$ ; 当诊断分界点为 0.6 时  $Se = 65.85\%$ ,  $Sp = 95.45\%$ ,  $Kappa = 0.416$ ; 当诊断分界点为 0.8 时  $Se = 56.10\%$ ,  $Sp = 100\%$ ,  $Kappa = 0.367$

由上分析可见, 诊断分界点 = 0.4 时, 其  $Kappa = 0.477$ , 敏感性  $Se = 75.61\%$ , 特异性  $Sp = 86.36\%$ , 阳性预测值  $PV_+ = 31/33 = 93.94\%$ , 阴性预测值  $PV_- = 10/29 = 34.48\%$ ; 敏感性、特异性较好,  $Kappa$  高于其他诊断分界点, 当  $Kappa = 0.477$  时  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义, 其与诊断金标准——病理诊断的一致性较好。所以利用巢式 PCR 扩增血清 hTERT 对肺癌有诊断价值。

## 3 讨论

在当今的医疗条件下, 如何能够早期发现恶性肿瘤是提高其疗效的关键。理想的检测方法应该是取材无创或微创、方法简便能适应群体筛查、结果敏感特异性强。因此, 外周血肿瘤相关指标的检测及研究成为热门。目前在肺癌检测中已广泛应用于临床的有 CEA(癌胚抗原)、CYFRA21-1(细胞角蛋白片段)、NSE(神经原烯醇化酶)<sup>[3]</sup>。但是除 NSE 在小细胞肺癌的敏感度达到 60%~80%<sup>[4]</sup>, 其余敏感度均在 50% 以下<sup>[5]</sup>。本实验得出: 肺癌患者血清 DNA 浓度显著高于正常人群; 肺癌患者血清 hTERT 显著高于正常人群, 诊断分界点 = 0.4 时, 其与诊断金标准——病理诊断的一致性较好。外周血 DNA 和 hTERT 在肺癌诊断中具有临床应用价值, 为肺癌的早期诊断及筛查提供了新的手段, 其检测技术成熟, 方法简单, 易于掌握; 受检者痛苦小, 费用低, 易于接受, 且可批量检测用于群体筛查; 与病理诊断具有较好的一致性。因此, 该项指标具有较好的应用前景, 值得进一步研究推广。

## 参考文献:

- [1] Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of Free Circulation DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer [J]. Journal of Clinical Oncology, 2003, 21(21): 3902-3908.
- [2] Oh S, Song YH, Yim J, et al. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene [J]. Oncogene, 2000, 19(11): 1485-1490.
- [3] 陆慰萱. 呼吸系统疾病诊断与治疗学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 443-449.
- [4] 张昕, 张湘茹. 肺癌肿瘤标志物的临床价值[J]. 癌症进展杂志, 2005, 3(3): 156-162.
- [5] Ando S, Kimura H, Iwai N, et al. Optimal combination of seven tumor markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Research, 2001, 21(4): 3085

[编辑: 刘红武; 校对: 马福元]