

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 Diagnose of Lung Cancer

WANGJing, 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 diagnose 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 quantificated, then hTERT sequences was amplified by nested PCR using gene primers. **Results** Mean concentration of serum DNA between patients with lung cancers and healthy persons was 33.464 $\mu\text{g/ml}$ and 18.420 $\mu\text{g/ml}$ 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 a approach with moderate veracity to detect lung cancers. Meanwhile, it had a good coherence with pathology ($\text{Kappa} = 0.477, P < 0.01$). **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 a 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 $\text{Kappa} = 0.477$, ($P < 0.01$),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^[1]。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^[2]。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:期 14 例、期 18 例、a 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(BSCOSS₂),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 accession 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'-GCGTTTGGTGGA TGATTTCT-3'

hTERT-down (P2): 5'-CAA GACCCCAAA GA GTTTGC-3'

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

hTERT-down (P4): 5'-CAA GACCCCAAA GA GTTTGC-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 Chemi Doc,意大利 Bio-RAD;紫外可见分光光度计 Ultrospec3100,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 μ l PK(蛋白酶)置入 1.5 ml 微量离心管,取 120 μ l 血清移至上管,并移入 120 μ l Lysis Buffer,混匀 15 秒,56 温浴 10 min;加 300 μ l Binding Buffer 至上管,加入 12 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l DNA 产物溶于 500 μ l 去离子水中,稀释 200 倍,取 90 μ l 去离子水入比色皿作为对照,放入紫外可见分光光度计比色架进行标准化;擦净比色皿,移入 90 μ l 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

(μ g/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 μ l):10 \times Reaction Buffer 2.5 μ l;dNTP Mixture(2.5 mmol/l each)2 μ l;Taq(2.5 u/ μ l)0.35 μ l;GAPDH-up(10 μ mol/l)1 μ l;GAPDH-down(10 μ mol/l)1 μ l;DNA 产物 2 μ l;ddH₂O 16.15 μ l

反应体系加石蜡油 20 μ l。

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 μ l 用于第二次扩增。

第二次扩增,PCR 扩增体系(25 μ l):10 \times Reaction Buffer 2.5 μ l;dNTP Mixture(2.5 mmol/l each)2 μ l;Taq(2.5 u/ μ l)0.3 μ l;GAPDH-up(10 μ mol/l)1 μ l;GAPDH-down(10 μ mol/l)1 μ l;第一次扩增产物(1%)4 μ l;ddH₂O 14.2 μ l

反应体系加石蜡油 20 μ l。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 μ l 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 \pm 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 33.463 7 μ g/ml,标准差为 9.451 18,95% CI(30.48,36.45) μ g/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 18.420 0 μ g/ml,标准差为 5.562 94,95% CI(14.44,22.40) μ g/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,ddH₂O 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

Pathology	hTERT					Total
	0 ~	0.21 ~	0.41 ~	0.61 ~	>	
	0.2	0.4	0.6	0.8	0.8	
Malign	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。

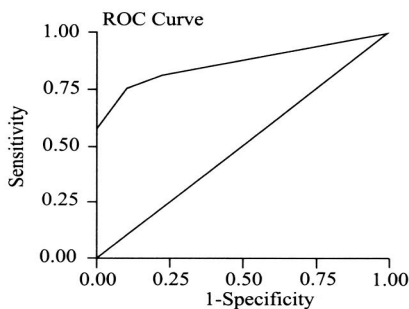


图 1 血清 TERT 诊断肺癌的 ROC 曲线

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)^[3]。但是除 NSE 在小细胞肺癌的敏感度达到 60 % ~ 80 % 外^[4], 其余敏感度均在 50 % 以下^[5]。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诊断分析[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]