

• 临床研究 •

小细胞肺癌患者血浆循环 DNA 定量检测和完整性分析

朱建凯,朱海燕,龙文娟
(青岛市精神卫生中心检验科,山东青岛 266034)

摘要:**目的** 定量检测小细胞肺癌患者血浆循环 DNA 并进行完整性分析。**方法** 收集 60 例肺癌患者(病例组)、40 例健康者(对照组)样本,采用实时荧光定量 PCR,以管家基因 GAPDH 为目的基因定量检测血浆 DNA 水平;以肌动蛋白基因 β -actin 为目的基因(长片段 543 bp,短片段 230 bp)分析完整性。应用 SPSS19.0 统计统计进行数据分析。**结果** 病例组患者血浆 DNA 水平 $[(3.105 \times 10^5 \pm 0.923 \times 10^5) \text{copies}/\mu\text{L}]$ 高于对照组 $[(1.522 \times 10^5 \pm 3.241 \times 10^4) \text{copies}/\mu\text{L}]$ 。病例组患者血浆 DNA 完整度指数 (0.2082 ± 0.1328) 明显高于对照组 (0.07796 ± 0.0386) ,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 小细胞肺癌患者血浆循环 DNA 水平和完整度均高于健康者。

关键词:癌,小细胞; 肺肿瘤; DNA/血液; 血液循环; DNA 完整性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.02.054 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)02-0262-02

小细胞肺癌(SCLC)约占肺癌的 20%,恶性程度高,转移早而广泛。目前用于检测和诊断 SCLC 的常见方法有影像学 and 肿瘤标志物如血清神经元特异烯醇化酶(NSE)、胃泌素释放肽前体(Pro-GRP)、细胞角质蛋白 19 片段抗原(CYFRA21-1)、癌胚抗原(CEA)和癌抗原 242(CA242)等。循环 DNA 是存在于血浆等体液中的游离 DNA, SCLC 患者肿瘤组织可通过细胞坏死、凋亡等方式释放出,其水平与肿瘤进展、治疗及预后密切相关^[1]。循环 DNA 的完整性为长片段与短片段 DNA 的比值^[2]。本研究对 SCLC 患者循环 DNA 水平进行了检测,计算其完整度,旨在探讨循环 DNA 的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 60 例肺癌患者(病例组)中男 42 例,女 18 例;年龄 33~79 岁,中位年龄 58 岁。另选择 41 例健康者作为对照组。所有血液标本均使用乙二胺四乙酸二钾真空采血管收集,取自患者术前。采血后 3 500 r/min 离心 10 min 分离血浆,取上清液,获得无血细胞成分的血浆,用 1.5 mL 离心管分装。

1.2 DNA 抽提及检测^[3] DNA 抽提使用 QIAamp DNABlood Mini Kit(Qiagen)试剂盒。循环 DNA 水平检测使用实时荧光定量 PCR,以管家基因 GAPDH 为目的基因(表 1),引物序列参照相关文献设计。DNA 样本与 SYBR Green I 荧光染料以 1:100 混合,使用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)定量检测,根据各自设定的临界值的循环数(Ct)值,计算循环 DNA 原始拷贝数,进一步分析实验室和对照组标本 DNA 水平。

1.3 DNA 完整性分析 参照文献^[4],选用肌动蛋白基因 β -actin 为目的基因。设计引物扩增长片段 543 bp,短片段 230 bp。所有引物由上海生工生物工程公司合成。采用普通 PCR 仪扩增目的基因,反应条件:95 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。完整度计算为长片段与短片段 PCR 扩增产物比值。琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 DR01 购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SCLC 患者与健康者 DNA 水平及完整性指标比较采用独立样本非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 标本 DNA 纯度以 A260/280 值判

断,病例组和对照组分别为 1.81、1.85,可满足实验需要。扩增曲线和溶解曲线提示荧光定量 PCR 的实验条件良好。

表 1 目的基因及引物序列

目的基因	引物序列	扩增长度 (bp)
GAPDH	5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3' (上游)	142
	5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3' (下游)	
β -actin	5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3' (上游)	543
	5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TG-3' (下游)	
	5'-CTC TCT GCT CCT CCT GTT CGA CAG-3' (上游)	230
	5'-GTG GAA TCA TAT TGG AAC ATG T-3' (下游)	

2.2 两组研究对象血浆循环 DNA 水平比较 病例组患者血浆 DNA 水平 $[(3.105 \times 10^5 \pm 0.923 \times 10^5) \text{copies}/\mu\text{L}]$ 高于对照组水平 $[(1.522 \times 10^5 \pm 3.241 \times 10^4) \text{copies}/\mu\text{L}]$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 循环 DNA 完整度分析 以肌动蛋白基因 β -actin 为模板,病例组患者血浆 DNA 完整度指数 (0.2082 ± 0.1328) 明显高于对照组 (0.07796 ± 0.0386) ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨 论

循环 DNA 来源于细胞凋亡(正常人群,长度 185~200 bp)和细胞坏死(肿瘤患者,以长链 DNA 片段为主)^[3,5-6]。肺癌在演化的不同阶段会伴随特定基因的改变,这些改变了的 DNA 片段会进入血循环中。有研究发现,血浆中游离 DNA 具有一定的肿瘤源性,因为其基因改变与肿瘤中的基因改变具有一致性。由于肿瘤患者细胞坏死所释放的游离 DNA 以长片段为主,其完整度高于健康者^[7]。本研究 60 例小细胞肺癌患者血浆循环 DNA 水平和完整度均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),与已有研究结论一致^[8]。由于血浆循环 DNA 水平很低,本研究进一步证实实时荧光定量 PCR 方法在灵敏度、重复性和准确度方面均能满足临床需要^[9]。

值得注意的是,检测标本采用血浆而不是血清主要原因是血液凝固时白细胞破裂,释放 DNA,不能完全反应循环 DNA 的真实水平。此外系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎^[10]和白血病^[4]、食管癌^[11]等疾病时也会释放长片段 DNA,因此,血浆

游离 DNA 完整性对 SCLC 诊断的特异性不高。

参考文献

- [1] Zitt M, Müller HM, Rochel M, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing pre-operative chemoradiation; a potential diagnostic tool for therapy monitoring[J]. Dis Markers, 2008, 25(3): 159-165.
- [2] 郁佳佳, 施维, 鞠少卿. 循环游离 DNA 完整性检测的临床应用研究进展[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(2): 121-123.
- [3] Board RE, Williams VS, Knight L, et al. Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 98-107.
- [4] 高玉洁, 杨再林, 钟晓明, 等. 白血病患者循环 DNA 定量和完整性分析及其临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(1): 24-27.
- [5] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer[J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 112-123.
- [6] Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, et al. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer

patients[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 18925-18958.

- [7] El-Shazly SF, Eid MA, El-Souroy HA, et al. Evaluation of serum DNA integrity as a screening and prognostic tool in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Int J Biol Markers, 2010, 25(2): 79-86.
- [8] 任晓宾. 基于血浆游离 DNA 浓度和完整性的肺癌非侵入性诊断价值研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [9] 杨英俊, 陈辉. 肝癌患者血浆端粒酶逆转录酶基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(12): 1380-1383.
- [10] Swaminathan R, Butt AN. Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075: 1-9.
- [11] Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, et al. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer[J]. Anticancer Res, 2007, 27(4C): 2737-2741.

(收稿日期: 2015-08-31)

• 临床研究 •

多项肿瘤标志物联合检测在健康体检中的应用价值

窦心灵¹, 赵桂良², 柴凤霞¹, 樊玉兰¹, 窦晓军¹

(酒泉市人民医院: 1. 检验科, 2. 医学体检中心, 甘肃酒泉 735000)

摘要:目的 探讨多项肿瘤标志物联合检测在健康体检者恶性肿瘤早期诊断中的应用价值。方法 对 2 405 例 35 岁以上的男性体检者进行血浆肿瘤特异性生长因子(TSGF)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类癌抗原(CA)199、总前列腺特异性抗原(T-PSA)及胃蛋白酶原(PG) I / II 联合检测, 对 2 395 例 35 岁以上的女性体检者进行血浆 TSGF、AFP、CEA、CA199、CA125 及 CA153 联合检测。结果 男性健康体检者 TM 检测阳性率中 TSGF+CEA 与 CEA 比较, TSGF+CEA+AFP 与 AFP 比较, TSGF+CEA+CA199 与 CA199 比较, TSGF+CEA+T-PSA 与 T-PSA 比较, TSGF+CEA+PG I / PG II 与 PG I / PG II 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。女性健康体检者 TM 检测阳性率中 TSGF+CEA 与 CEA 比较, TSGF+CEA+AFP 与 AFP 比较, TSGF+CEA+CA199 与 CA199 比较, TSGF+CEA+CA125 与 CA125 比较, TSGF+CEA+CA153 与 CA153 比较, TSGF+CEA+CA125+CA153 与 TSGF+CEA+CA125 比较, TSGF+CEA+CA125+CA153 与 TSGF+CEA+CA153 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 多项 TM 联合检测提高了恶性肿瘤早期诊断的灵敏度和特异性, 有助于提高检测阳性率, 减少漏诊, 更适宜于 35 岁以上健康体检者的早期肿瘤筛查。

关键词: 肿瘤标志物; 联合检测; 健康体检

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 02. 055

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)02-0263-03

近年来, 由于受到环境污染、不良生活方式及人口老龄化的影响, 恶性肿瘤的发病率呈逐年上升趋势, 而早诊断、早治疗是提高肿瘤患者生存率和治愈率的关键。肿瘤标志物(TM)检测作为早期发现无症状微灶肿瘤的有效途径, 可先于超声、CT、MRI 或 PET-CT 等物理检查发现肿瘤。随着人们健康意识的增强及健康体检产业的兴起, TM 检测也逐渐成为健康体检中的重点项目^[1]。然而, 目前用于临床诊断的 TM 检测均为非特异性肿瘤抗原, 因单项 TM 对肿瘤诊断的灵敏度均不够理想, 且在肿瘤早期血液浓度往往较低, 因而在肿瘤筛查和早期诊断中有一定局限性^[2]。本研究通过对 4 800 例健康体检者进行多项 TM 的联合检测, 旨在探讨其在健康体检者恶性肿瘤早期诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1 月至 2015 年 4 月本院医学体检中心的健康体检者 4 800 例, 其中男 2 405 例, 女 2 395 例, 年龄 35~80 岁, 平均(55.0±22.1)岁。所有男性体检者均进行血浆肿瘤特异性生长因子(TSGF)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原

(CEA)、糖类癌抗原(CA)199、总前列腺特异性抗原(T-PSA)及胃蛋白酶原(PG) I / II 联合检测, 所有女性体检者均进行血浆 TSGF、AFP、CEA、CA199、CA125 及 CA153 联合检测。并排除已确诊为恶性肿瘤的患者。

1.2 仪器与试剂 TSGF 试剂盒由福建新大陆生物技术公司提供, 在上海精密科学仪器有限公司 721 分光光度计上检测; AFP、CEA、CA199、T-PSA、PG I / PG II、CA125 及 CA153 均在美国雅培公司 ARCHITECT PLUS i2000 SR 全自动化学发光分析仪上检测, 均采用化学发光法, 所有试剂盒均由美国雅培公司提供。

1.3 检测方法 采集所有检测对象空腹静脉 5 mL, 置于含有肝素钠的真空抗凝管, 以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆进行检测。

1.4 判定标准 正常参考范围: TSGF<64 U/mL、AFP<20 ng/mL、CEA<5 ng/mL、CA125<35 U/mL、CA153<35 U/mL、CA199<35 U/mL、T-PSA<4 ng/mL、PGI/PGII>3。检测结果高于以上临界值即判为阳性, PGI/PGII≤3 判为阴性。