DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.025
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
434 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0434-03

# 肺癌患者血浆游离DNA微卫星检测的意义

易 斌[1],杨和平[2],阮志华[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]麻醉科,[2]呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 研究肺癌患者血浆游离性肿瘤DNA微卫星不稳定(Microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(Loss of heteroxygosity, LOH)在肺癌基因检测中的价值。方法 通过PCR-银染法检测肺癌病人的37例新鲜手术标本、94例全血标本DNA 3p部位三个微卫星位点的LOH、MSI。结果 大多数肺癌患者的血浆游离DNA的浓度在微克水平以上。联合三个位点进行LOH、MSI检测时,组织和血浆的阳性率均在70%以上。不同分期、不同病理类型之间差异不显著;有无淋巴结转移之间差异有显著性意义。结论 血浆游离DNA水平检测肺癌可以作为肺癌基因检测的新途径。

关键词:肺癌,微卫星,血浆DNA,基因诊断
中图法分类号:R342.3;R446.9;R734.2 文献标识码:A

# The significance of microsatellite analysis of plasma free DNA in diagnosis of lung cancer

YI Bin, YANG He-ping, RUAN Zhi-hua (Department of Anesthesia, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To study the diagnostic value of LOH and MSI of free DNA 3p microsatellite point in plasma of lung cancer patients. **Methods** Using PCR and sliver-dye techniques, LOH and MSI of three microsatellite sites of plasma DNA on chromosome 3p in resected fresh tissue from 37 patients and whole blood sample from 94 patients were detected. **Results** The plasma free DNA concentration of most lung cancer patients was above microgramme level. Above 70% of tissues and plasma were positive. No significant difference was found at different stages and in different pathologic types. The result of patients with lymph node metastasis was significantly different from that of the patients without lymph node metastasis. **Conclusion** Plasma DNA of lung cancer patients is a good medium for gene diagnosis and may be used widely in the future.

**Key words**: lung cancer; plasma DNA; microsatellite; gene diagnosis

近年来,对恶性肿瘤患者血浆中游离性DNA的定性检测用于肿瘤基因诊断已经成为研究热点。本研究检测肺癌患者血浆中游离DNA的3p位点的微卫星(Microsatellite, MS)改变-微卫星不稳定(Microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(Loss of heteroxygosity, LOH),旨在为临床诊断肺癌探索新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

所有病例均为住院病人;年龄36~71岁,以病理诊断作为确诊依据;经检查无肝炎、糖尿病、风湿病、红斑狼疮等疾病。新鲜手术组织标本37例(SCLC 13例、NSCLC 24例)。外周血标本94例(SCLC 33例、NSCLC 61例)。15例健康者和15例肺结核患者的外周全血标本作为对照。

### 1.2 研究方法

1.2.1 取材方法 术前1 d抽取全血3 ml,枸橼酸钠(ACD)抗凝,术后1~3 h在癌中心无明显出血坏死处切取直径1~2 cm的组织,置-70 ℃冰箱保存备用,石蜡切片证实组织标本中肿瘤细胞占70%以上。

1.2.2 DNA抽取 所有标本的DNA抽取均用常规蛋白酶K消化、酚-氯仿抽提,-20 ℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增 3对MS位点引物见表1,进行评测和同源性比较后用于下一步反应。在50 μl PCR反应体系中加入基因组DNA 1 μl,5 μl 10X PCR缓冲液,dNTP 200 μmol/L,1对引物各20 pmol/L,TaqDNA聚合酶0.5 U,加30 μl高压消毒甘油覆盖反应液;热启动法,97 ℃变性10 min,随后降至88 ℃加酶,循环条件为94 ℃ 60 s,54~57 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,38个循环后72 ℃延伸10 min。

1.2.4 凝胶电泳 PCR产物经1.5%琼脂糖电泳检测特异性后,取4 μl用相同体积的甲酰胺变性示踪液(95%去离子甲酰胺、0.5%二甲苯氰蓝、0.5%溴酚蓝、20 mmol/L EDTA、5 mmol/L NaOH、25%蔗糖)稀释,95 ℃变性10 min后用于电泳。含7 mol/L尿素8%变性聚丙烯酰胺凝胶先在恒流50 mA下预电泳1 h,随后上样、恒流5~10 mA,电泳3~4 h。

基金项目:第三军医大学校管课题(9802)
作者简介:易 斌(1974-),男,四川省自贡市人,硕士,主治医师,主要从事恶性肿瘤诊治方面的研究。电话:(023)68754200
收稿日期:2002-12-01;修回日期:2003-02-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　3 对 MS 位点引物序列、目标片断大小和重复形式

**Tab 1　The position and distance of primers**

| Locus | Map | primers sequence (5′-3′) | product size (bp) | polymorphism type |
|---|---|---|---|---|
| D3S1038 | $3p^{25}$ | TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG | 115～141 | GT |
| | | AAAGGGGTTCAGGAAACCTG | | |
| D3S1029 | $3p^{21}$ | TACCTCCTCACTGTTTCATATTAG | 160～174 | GT |
| | | CACATAGTATGTCTCGGCTAACAG | | |
| D3S1228 | $3p^{14}$ | TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG | 78～96 | GT |
| | | TCTACGAAAGGGATTAGGAAGGA | | |

1.2.5　银染　　各组份均用去离子水配制、4 ℃避光保存。取下凝胶、去离子水洗 1 遍后, 用固定液(10%乙醇、0.5%冰乙酸)固定 20 min, 去离子水洗两遍; 染色液(1.5%硝酸银)染色 15 min, 去离子水洗 3 遍(< 5 s/遍); 显色液(1.5% NaOH、0.4%甲醛)显色至条带清晰; 用等体积定影液(0.5% $Na_2CO_3$)定影 5 min, 水洗两遍; 用保鲜膜包裹, 室温下干胶, 永久保存。

1.2.6　LOH 判定　　和白细胞的结果对照, 血浆或病理组织的结果出现条带缺失或亮度减少 50%以上, 判定为 LOH; 条带增多或移位, 判定为 MSI。异常病例需经再次 PCR、电泳证实。

### 1.3　统计学处理

使用 Excel 软件进行描述统计和 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　血浆游离 DNA 的含量水平

95%以上肺癌患者血浆游离 DNA 的浓度在 1 μg/ml 以上; 平均为 14.2 μg/ml。对照组血浆游离 DNA 含量在微克水平以下, 平均 0.15 μg/ml。提示微克水平有一定的诊断意义。

### 2.2　血浆游离 DNA 的 MSI、LOH

2.2.1　血浆与肺癌原发灶的 MS 检测的一致性　　肿瘤原发灶组织标本和血浆均来自同一个体的 37 例中, 15 例发生了 LOH 的组织标本其对应的血浆标本中有 13 例检测到了相同的改变, 一致性为 86.7%; 在 12 例 MSI 阳性的组织标本中, 其对应的血浆中有 9 例检测到了相同的 MSI, 一致性 75%。有 2 例未发生 MSI、LOH 的组织标本其对应的血浆中检测到有 LOH、MSI; 有 1 例的血浆在不同的 MS 位点发生了 MSI。

2.2.2　三个 MS 位点在血浆游离 DNA 中的 MSI、LOH　　各位点 LOH + MSI 的阳性率为 40% ~ 60%, 以 $3p^{21}$ 最高, 达到 50.0%。三个位点总的 MS 改变的阳性率为 78.7%, 有 37.2%的病例呈多位点的 MS 改变, 见表 2。对照组血浆中未检测到任一位点的 MS 改变。

表 2　血浆游离 DNA 各位点中的 MSI、LOH

**Tab 2　The frequencies of LOH and MSI at different loci**

| Locus | Map | Total number of patients | LOH(%) | MSI(%) | LOH+MSI(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| D3S1038 | $3p^{25}$ | 94 | 24(25.5) | 11(11.7) | 35(37.2) |
| D3S1029 | $3p^{21}$ | 94 | 32(34.0) | 15(16.0) | 47(50.0) |
| D3S1228 | $3p^{14}$ | 94 | 22(23.4) | 10(10.6) | 32(34.0) |
| One locus | | 94 | 50(53.2) | 24(25.5) | 74(78.7) |
| At least two loci | | 94 | 28(29.8) | 12(12.8) | 35(37.2) |

$P < 0.05$ $3p^{21}$ *vs* $3p^{14}$

2.2.3　血浆 DNA 的 MSI、LOH 与临床病理的关系

2.2.3.1　MSI 和 LOH 与病理类型间的关系　　不同病理类型(NSCLC 和 SCLC)的 LOH、MSI 阳性率的结果分类总结在表 3 中, 可以看出 SCLC 在 LOH、MSI 上均要高于 NSCLC, 总体相差 9.4%, 但无统计学上的差异($P > 0.05$)。

表 3　血浆中游离 DNA 的 MSI、LOH 与病理的关系

**Tab 3　The relation between pathology and MSI LOH**

| | Total number of patients | LOH(%)* | MSI(%)* | LOH+MSI(%)* |
|---|---|---|---|---|
| NSCLC | 61 | 32(52.5) | 14(23.0) | 46(75.4) |
| SCLC | 33 | 18(54.5) | 10(30.3) | 28(84.8) |
| Total | 94 | 50(53.2) | 24(25.5) | 74(78.7) |

*: MS changes at least one locus

2.2.3.2　MSI 和 LOH 与肺癌淋巴结转移的关系　　$N_1$ 与 $N_0$ 之间有显著性差异($P < 0.05$)。$N_1$ 和 $N_2$ 之间差异不显著, 说明血浆游离 DNA 的 MSI 和 LOH 在判断是否存在淋巴结转移上有意义, 但在判断转移程度上不具有意义, 见表 4。

表 4　血浆 DNA LOH、MSI 与肺癌淋巴结转移的关系

**Tab 4　The relation between lymph node metastasis and MSI LOH**

| Period of lymph node metastasis | *n* | LOH+MSI | % |
|---|---|---|---|
| $N_0$ | 28 | 17 | 60.7 |
| $N_1$ | 57 | 49 | 86.0 |
| $N_2$ | 9 | 8 | 88.9 |

2.2.3.3　MSI 和 LOH 与分期的关系　　可以看出Ⅰ～Ⅳ期均可检测到 LOH 或 MSI。从Ⅰ期到Ⅳ期的 LOH、MSI 的阳性率均呈上升趋势, 但统计学计算表明各期之间无显著性差异($P > 0.05$), 见表 5。

表 5　各临床分期的 LOH、MSI 阳性率

**Tab 5　The rates of MSI and LOH at different stages**

| TMN | *n* | LOH(%)* | MSI(%)* | LOH+MSI(%) |
|---|---|---|---|---|
| Ⅰ ($T_{0\sim1}N_0M_0$) | 23 | 9(39.1) | 6(26.1) | 15(65.2) |
| Ⅱ ($T_{0\sim1}N_1M_0$) | 35 | 20(57.1) | 8(22.9) | 28(80.0) |
| Ⅲ($T_{3\sim4}M_0$、$N_{2\sim3}M_0$) | 27 | 16(59.3) | 7(25.9) | 23(85.2) |
| Ⅳ($NM_1$) | 9 | 5(55.6) | 3(33.3) | 8(88.9) |

*: MS changes at least one locus

## 3　讨论

肿瘤病人血浆中的 DNA 含量明显增高的机理至今仍不明确, 目前的研究认为[1] 可能是早期进入血循环的肿瘤细胞破坏、DNA 降解酶活性受抑制等原因。本研究成功地检测到了 94 例不同分期、不同病理类型的肺癌患者血浆中游离 DNA 的浓度。结果显示 95%以上的肺癌患者血浆 DNA 含量在微克水平以上, 最高在 100 μg/ml 以上; 对照组血浆 DNA 含量均在微克水平以下。二者之间相差显著。因此认为血浆 DNA 微克水平具有一定的诊断意义。如果能在分子水平检测

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

到这些 DNA 的基因异常(即具有肿瘤特异性的基因改变),则血浆 DNA 将成为很有前景的恶性肿瘤诊断、监测指标[2,3]。

本研究运用 PCR-银染法,在 94 例肺癌患者血浆中成功的检测到了肺癌特异性的 3p 位点的 LOH 和 MSI,阳性率在 70%以上,与组织标本大致相当;而在对照组血浆中没有检测到有 MS 改变。研究结果发现各位点的 LOH 发生率在 20%~40%之间,MSI 有 10%~20%的阳性率;但三个位点的联合检测有 78.7%的阳性率,说明多位点检测可以明显提高诊断敏感性。在Ⅰ、Ⅱ期,血浆中游离 DNA 的 MS 检测阳性率达 74.1%,Ⅰ期就有 65.2%,具有较强的早期意义,可以作为肺癌早期诊断的一种新的途径。

有人[4]检测了肺癌痰液、支气管肺泡冲洗液等中的 $p^{53}$、k-ras 等基因突变,在 SCLC 获得了 50%以上的阳性率,但在 NSCLC 中阳性率低于 20%。本研究发现 NSCLC 也有 75.4%的阳性率,高于 k-ras、$p^{53}$ 基因的检测;亦高于头颈部癌(29%)、肾癌(65%)、乳腺癌(70%)[5]等,和胰腺癌血浆中 k-ras 基因突变(81%)相当[6],说明血浆 DNA 的 MS 检测是肺癌诊断的较有前景的指标。

以 TNM 分期法,Ⅰ期的阳性率在 65%左右,Ⅱ期的阳性率均在 80%以上,Ⅲ、Ⅳ期更高,阳性率呈上升趋势;统计学表明各期之间 $P>0.05$。同时研究发现没有淋巴结转移的肺癌,其血浆 DNA MSI 和 LOH 的阳性率为 60.7%,有淋巴结转移组为 86.0%;相差有非常显著性意义,$P<0.01$;说明血浆游离 DNA 的 LOH、MSI 的检测对于发生了淋巴结转移的肺癌有更好的诊断敏感性。虽然 PCR 结合银染的检测方法目前仍存在技术复杂性和高成本等缺点,但是肺癌血浆中游离性肿瘤 DNA 作为一个新的检测途径,结合迅猛发展的基因芯片等技术,具有非常广阔的应用前景。

参考文献:


[1] Jose M S, Gemma Dominguez, Jose M G, *et al*. Presence of Tumor DNA in Plasma of Breast Cancer Patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): 3251—3256

[2] Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, *et al*. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 707—711.

[3] Mayall F, Fairweather S, Wilkins R, *et al*. Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(5): 363—366.

[4] 王 翎, 王光杰, 夏学鸣, 等. 痰液癌基因突变的检测在肺癌诊断中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21(4): 156—158.

[5] Nawroz H, Koch W, Anker P, *et al*. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients[J]. Nat Med, 1996, 2(9): 1035—1037.

[6] Mulcahy H E, Lyartey J, Ledderey C, *et al*. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients[J]. Clin Cancer Research, 1998, 4(2): 271—275.


(编辑 冷怀明)

# 关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W 等和 $10^6$ 以上的词头,例如:M、G、T 等的首字母大写以外均为小写,"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

(本刊编辑部)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net