DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.029
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0341-03

论著

小细胞肺癌血浆中游离性DNA的3p位点杂合性缺失

易 斌[1],杨和平[2],阮志华[3] (第三军医大学附属西南医院:[1]麻醉科;[2]呼吸科;[3]肿瘤科;重庆 400038)

提 要:目的 研究小细胞肺癌(Small cell lung cancer,SCLC)患者血浆游离性DNA的3p位点的杂合性缺失(Loss of heteroxygosity,LOH)在SCLC诊断中的价值。方法 用PCR-银染法对33例SCLC患者的病理组织及血浆标本中三个位点微卫星(3p14、3p21、3p25)杂合性缺失的情况。结果 33例病理组织标本LOH的发生率为54.5%(18/33),血浆游离DNA同时发生LOH的百分率为42.4%(14/33);二者相关性为77.8%(14/18)。结论 SCLC患者血浆游离DNA来自于肿瘤组织,其3p部位的LOH在诊断中有一定的价值。

关键词:小细胞肺癌;杂合性缺失;血浆游离DNA
中图法分类号:R394.3;R446.11;R734.2 文献标识码:A

The loss of heterozygosity on chromosome 3 of plasma free DNA of small cell lung cancer

YI Bin, YANG He-ping, RUAN Zhi-hua (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the diagnostic and monitoring values of the loss of heteroxygosity (LOH) of 3p loci in free plasma DNA of small cell lung cancer. Methods PCR silver staining was used for the detection of LOH of three microsatellite sites in the 3p loci of plasma free DNA and tissue of SCLC. Results In 33 cases of tissue, the incidence rate of LOH was 54.5%(18/33), but the positive rate of LOH in plasma free DNA was 42.4%(14/33). The correlation between them was 78.8%(14/18). Conclusion The plasma free DNA in patients with lung cancer is primarily originated from the tumor tissue. LOH of plasma free DNA may be valuable molecular markers in the diagnosis of SCLC.

Key words: lung neoplasm; LOH; plasma DNA

近年来,对恶性肿瘤患者血浆中游离性DNA的定性检测用于基因诊断已经成为热点。我们对血浆中游离性DNA的3p部位杂合性缺失(Loss of heteroxygosity,LOH)在小细胞肺癌(Small cell lung cancer,SCLC)诊断中的价值进行了研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象

有病理诊断的SCLC手术病例33例,其中男性19例,女性14例,年龄39~71岁,分期Ⅰ~ⅢA期;排除同时患有肝炎、糖尿病、风湿病、红斑狼疮等疾病的病例。15例健康正常人外周血标本作为对照。

1.2 研究方法

1.2.1 取材方法 血液标本在术前1 d凌晨空腹状态下抽取3 ml,用枸盐酸钠抗凝剂(ACD)抗凝,4 ℃冰箱保存,1周内使用。癌灶标本在术后1~3 h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,石蜡切片证实肿瘤细胞数占70%以上。

1.2.2 DNA抽提 所有标本的DNA抽提均用常规蛋白酶K消化、酚-氯仿抽提,经紫外分光光度计定量,将浓度稀释到350~450 ng,-20℃保存备用。可疑标本重复抽取。

1.2.3 PCR扩增 3对微卫星位点引物均由上海生物制品有限公司合成,见表1。在50 μl PCR反应体系中加入基因组DNA 1 μl,5 μl 10× PCR缓冲液,dNTP 200 μmol/L,1对引物各20 pmol/L,*Taq* DNA聚合酶0.5 U,加30 μl高压消毒甘油覆盖反应液;采用热启动法,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。

表1 引物的位置和距离

Tab 1 The position and distance of primers

Locus	Map	Primers sequence(5′—3′)	Produced size (bp)	Polymorphism type
D3S1038	3P25	TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG AAAGGGGTTCAGGAAACCTG	115~141	GT
D3S1029	3P21.3	TACCTCCTCACTGTTTCATATTAG CACATAGTATGTCTCCGCTAACAG	160~174	GT
D3S1228	3P14.1~14.3	TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG TCTAGGAAAGGGATTAGGAAGGA	78~96	GT

基金项目:校管基金资助项目(X98-02)
作者简介:易 斌(1974-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事肺癌方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754200
收稿日期:2002-04-27;修回日期:2002-06-30

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

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。

1.2.5 银染 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2遍；染色液(1.5%硝酸银)染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2遍；用保鲜膜包裹，室温下干胶、永久保存。

1.2.6 LOH判定 与自身白细胞对比，癌组织DNA PCR扩增产物带消失或相对密度减少50%以上时判为LOH。异常病例需经再次PCR、电泳证实[11]。

1.3 统计学处理

采用Excel软件进行描述统计和χ^2检验，所有数据用$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 血浆DNA的含量

通过酚氯仿法-紫外分光光度法定量分析，SCLC患者和对照组的血浆均有游离DNA。SCLC患者血浆游离DNA的浓度为(15.2±0.72)μg/ml，15例正常对照的浓度为(0.15±0.032)μg/ml，两者之间相差非常显著($P<0.01$)。

2.2 各微卫星位点LOH情况

33例病理组织标本至少一个位点发生LOH的发生率为54.4%(18/33)，血浆游离DNA LOH发生率为42.4%(14/33)，相关性为78.8%(14/18)。三个微卫星位点位置，具体LOH的例数百分率见表2。

表2 不同位点的LOH发生率

Tab 2 The frequencies of LOH at different loci

Locus	LOH of tissue(%)	LOH of plasma(%)
D3S1038	27.3(9/33)	15.2(5/33)
D3S1029	33.3(11/33)	27.3(9/33)
D3S1228	21.2(7/33)	18.2(6/33)
At least one locus	54.5(18/33)	42.4(14/33)

3 讨论

既往研究证实胃肠道恶性肿瘤患者血浆中含有较高浓度且呈游离状态的DNA，随后有研究证实可以从乳腺癌、肾癌、鼻咽癌患者血浆的游离DNA中检测到肿瘤特异性的基因改变。我们应用酚氯仿-紫外分光光度法在33例SCLC患者血浆中同样检测到了游离DNA。相对于正常人(0.15±0.032)μg/ml，其浓度显著增高(15.2±0.72)μg/ml。由于游离DNA的浓度易受少数良性病如风湿性疾病、免疫性疾病等的影响，故需要同时检测肿瘤特异性基因变化才能用于诊断。

目前的研究表明，恶性肿瘤的LOH阳性率较p53、k-ras等要高，而且在癌前病变中广泛存在(总阳性率高于70%)，故非常适合于早期诊断[2]。Cansten Goessl等报道乳腺癌、肾癌、鼻咽癌、黑色素瘤等患者血浆游离DNA微卫星LOH阳性率在40%~90%不等[3~5]。我们的研究表明在33例SCLC患者血浆中有14例至少一个微卫星位点可以检测到LOH，阳性率为54.5%，证实血浆微卫星LOH的检测在SCLC具有较高的阳性率。病理组织的研究表明微卫星LOH只发生于肿瘤组织，正常组织很少发生改变[6]，在我们的研究中，作为对照的15例正常人外周血标本中无一例发生了LOH，表明在SCLC患者血浆中一样具有肿瘤特异性。同时33例组织标本中有18例至少一个位点发生了LOH(54.5%)，在这18例中有14例的血浆中检测到相同的LOH(78.8%)，证明组织标本和外周血浆具有明显的一致性。

LOH研究的假阴性主要来自于正常DNA的污染，一般要求纯度>70%；血浆正常DNA的污染主要来自于糖尿病、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等良性疾病；Naylor、Chen、Soaai等[7~9]在研究中均未考虑到这个问题，我们在选择病例时筛除了患有上述良性疾病的病例，降低了假阴性率。LOH的假阳性主要来自于实验误差和结果误判，通过重复实验可以有效的排除假阳性结果。方法上，我们采用了PCR-银染法，比放射自显影法在操作上更加简单、快捷，适用于临床应用。

肺癌组织的LOH用于基因诊断有特异性高、敏感性强、简单、快捷等优点，但病理组织取材限制了它的应用(如：有创性、复杂性，早期取材困难等)。我们的研究表明，肿瘤患者外周血浆中的游离DNA作为一种新的诊断途径有很强的应用前景；其3p部位的LOH在SCLC诊断中的有较高的诊断价值。

参考文献：

[1] Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G, *et al*. Frequent microsatellite alteration on chromosome 3p in esophageal sequamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1995, 55(2): 891—894.

[2] Hung J, Kishimto Y, Sugio K, *et al*. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma[J]. JAMA, 1995, 273(7): 558—563.

[3] Jose M. Sillva, Gemma Dominguez, Jose M. Garcia, *et al*. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): 3251—3256.

[4] Goessl C, Hercappell R, Munker R, *et al*. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma[J]. Cancer Res, 1998, 58(10): 4728—4732.

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

[5] Fujiwara O, Dorcas D J, Wang H, *et al*. Plasma DNA microsatellite as tumor-specific markers and indicator of tumor progression in melanoma patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 1567—1571.
[6] 陈国安, 孙 燕, 李申德, 等. 肺癌组织中微卫星 DNA 的改变[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 2(3): 166—168.
[7] Chen X Q, Stroun M, Magnenat J L, *et al*. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients[J]. Nat Med, 1996, 2(5): 1033—1035.
[8] Soaai G, Musso K, Ratcliffe C, *et al*. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10): 2689—2692.
[9] Minna D. Tumor suppressor genes and oncogenes in lung cancer: potential clinical applications[J]. ADV Oncol, 1996, 12(1): 3.

（编辑 薛国文）

文章编号: 1000-5404(2003)04-0343-02

个案与短篇

妊娠妇女血清及脐血瘦素水平与胎儿生长发育的关系

Study on the relationship between the leptin levels in pregnant women and the growth of fetus

刘 虹, 蒋小亚, 孙 袁, 吴文锦 （贵阳市妇幼保健院产科, 贵阳 550003）

瘦素是由脂肪细胞分泌的肥胖基因的蛋白产物, 具有调节体内脂肪含量的功能。近年来国外研究报道, 瘦素与妊娠关系密切, 证实除脂肪组织外, 胎盘也能合成及分泌瘦素[1]。本研究通过测定妊娠妇女血清及脐血瘦素水平, 旨在探讨妊娠期瘦素水平的变化, 以及瘦素与胎儿生长发育的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2001 年 1 月至 2002 年 2 月在我院门诊就诊及住院的正常妊娠妇女 200 例为观察组, 其中早期妊娠（孕龄＜12 周）30 例, 中期妊娠（孕龄 12～27^{+6} 周）30 例, 晚期妊娠（孕龄 28～36^{+6} 周）30 例, 分娩期（孕龄 37～41^{+6} 周）80 例, 产后 1 周 30 例。年龄（25.7±3.2）岁, 均为单胎头位之初产妇, 排除内外科合并症及产科并发症。同期选择正常非妊娠妇女 30 例为对照组, 年龄（23.9±2.6）岁, 均排除严重内外科疾病。

1.2 方法

抽取两组孕妇肘静脉血及新生儿脐血, 于 4℃放置 24 h 后离心, 取血清置于－20℃冰箱保存待检。采用放射免疫测定（RIA）法测定血清及脐血瘦素水平, 药盒由美国 Linco Research 公司提供。批内变异系数为 5.6%, 批间变异系数为 7.8%。

1.3 统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。均数比较采用 t 检验, 相关指标分析采用直线相关分析。所有统计学计算由 SPSS 软件完成。

2 结果

2.1 两组妇女血清及脐血瘦素水平比较

观察组各期瘦素水平均高于对照组, 两组比较, 差异无显著性意义（$P>0.05$）。新生儿脐血瘦素水平明显低于血清瘦素水平, 两者比较, 差异有显著性意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 两组妇女血清及脐血瘦素水平比较（$\bar{x}\pm s$）

分类	对照组	观察组				
		早期妊娠	中期妊娠	晚期妊娠	分娩期	产后 1 周
例数	30	30	30	30	80	30
体重指数（kg/m²）	20.47±2.31	20.91±0.83	21.20±1.57	23.04±2.56	26.99±2.02	21.23±2.14
血清瘦素（μg/L）	7.51±3.41	9.55±2.58	11.85±4.86	19.11±6.15	24.67±5.23	9.30±5.39
脐血瘦素（μg/L）					9.29±3.11	

2.2 血清及脐血瘦素水平与妊娠相关因素分析

妊娠妇女血清瘦素水平与其体重指数呈正相关（$r=0.286$, $P<0.05$）, 与新生儿出生体重无关（$r=-0.135$, $P>0.05$）。脐血瘦素水平与新生儿出生体重呈正相关（$r=0.364$, $P<0.05$）, 血清瘦素水平与脐血瘦素水平无关（$r=-0.185$, $P>0.05$）。

3 讨论

3.1 妊娠期血清瘦素水平的变化及其临床意义

瘦素是肥胖基因的蛋白产物, 由脂肪细胞合成及分泌, 具有调节脂肪储存的功能。妊娠期母体发生一系列重大的生理变

（下转 346 页）

作者简介: 刘 虹（1959－）, 女, 四川省成都市人, 副主任医师, 主要从事产科临床方面的研究。电话: (0851) 5967401

收稿日期: 2002-06-15; 修回日期: 2002-09-10

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