DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.005
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1132 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1132-03

非小细胞肺癌患者血浆游离DNA 3p杂合性缺失的研究

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

提 要:目的 研究血浆游离DNA第3号染色体短臂的杂合性缺失(LOH)在非小细胞肺癌(NSCLC)诊断中的价值。方法 27例NSCLC手术病例在术前抽取全血,术后在癌中心切取组织。15例健康志愿者和76例非手术NSCLC患者也抽取全血标本。用PCR-银染法对NSCLC 27例手术病例、76例非手术病例血浆中游离DNA的3p部位进行LOH分析。结果 27例病理组织标本LOH的发生率为63%(17/27),在17例病理组织阳性的病例中,血浆游离DNA同时发生LOH的百分率为84.4%(14/17);76例非手术病例中,血浆游离DNA LOH的发生率为64.5%(49/76)。结论 血浆游离DNA 3p部位的LOH在NSCLC诊断中有一定的诊断价值。

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

Study on the loss of heterozygosity on chromosome 3p of plasma DNA from non-small cell lung cancer patients

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

Abstract: Objective To study the diagnostic value of the loss of heteroxygosity (LOH) on chromosome 3p of free DNA in plasma of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods Twenty-seven patients with NSCLC underwent blood extraction before the operation and 1—2 cm tissues were removed from their tumor center after the operation. Blood samples were also taken from 76 individuals, including 15 healthy volunteers and 76 NSCLC patients without surgery. Three microsatellite markers on chromosome 3p were examined in 27 tissue and 103 blood samples of NSCLC with PCR and silver staining. Results The incident rate of LOH was 63%(17/27) in 27 tissue specimens and 84.4%(14/17) in their plasma. The positive rate of LOH in 76 blood samples was 64.5%(49/76). Conclusion LOH of plasma free DNA may be a valuable molecular marker in the diagnosis of NSCLC.

Key words: lung neoplasm; LOH; plasma DNA

既往实验证实正常人血浆中有少量游离DNA,在恶性肿瘤患者中明显富集,只要结合特异性的肿瘤基因位点,可以用于早期诊断。为探讨血浆中游离DNA在非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)中的诊断价值,我们选择了3p14、3p21、3p25 3个微卫星位点进行了研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象

所有病例均为第三军医大学附属西南医院、新桥医院、大坪医院1999年1月至2000年2月期间未接受放疗和化疗的NSCLC住院病人;男67例,女36例,年龄36~71岁。经检查无明确的肝炎、糖尿病、风湿病、红斑狼疮等疾病。

1.2 研究方法

1.2.1 取材方法 27例NSCLC手术病例在术前1 d抽取全血3 ml,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,石蜡切片证实大多数肿瘤组织中肿瘤细胞数占70%以上。76例非手术病例及15例健康志愿者3 ml全血标本在凌晨空腹状态下抽取,用枸盐酸钠抗凝剂(ACD)抗凝,4 ℃冰箱保存,1周内使用。

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/ml之间,-20 ℃保存备用。可疑标本重复试验。

1.2.3 PCR扩增 3对微卫星位点引物见表1,均由上海生物制品有限公司合成。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,每对引物各20

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(X98-02)
作者简介:杨和平(1955-),男,重庆市人,博士,主任医师,教授,主要从事肺癌方面的研究。电话:(023)68754121
收稿日期:2000-04-27;修回日期:2000-07-23

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

pmol/ L, TaqDNA 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	Produce size(bp)	Polymorphism type
D3S1038	3p25	5′-TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG-3′	115~141	GT
		5′-AAAGGGGTTCAGGAAACCTG-3′		
D3S1029	3p21. 3	5′-TACCTCCTCACTGTTTCATATTAG-3′	160~174	GT
		5′-CACATAGTATGTCTCGGCTAACAG-3′		
D3S1228	3p14. 1—14. 3	5′-TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG-3′	78~96	GT
		5′-TCTACGAAAGGGATTAGGAAGGA-3′		

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, 去离子水洗两遍; 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　杂合性缺失(Loss of heteroxygoity, 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[1]。

1.3　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　血浆 DNA 的含量

NSCLC 患者和正常对照的血浆 DNA 同时通过酚氯仿法, 紫外分光光度法定量分析, 二者均有游离 DNA, 前者为(400±25) ng/ ml, 正常对照为(18±3) ng/ ml, 两者比较差异非常显著($P<0.01$)。

2.2　NSCLC 病理组织、血浆的杂合性丢失图谱

经过 PCR、变性聚丙烯酰胺电泳后, 用过银染法显示丢失图谱, 见图 1。

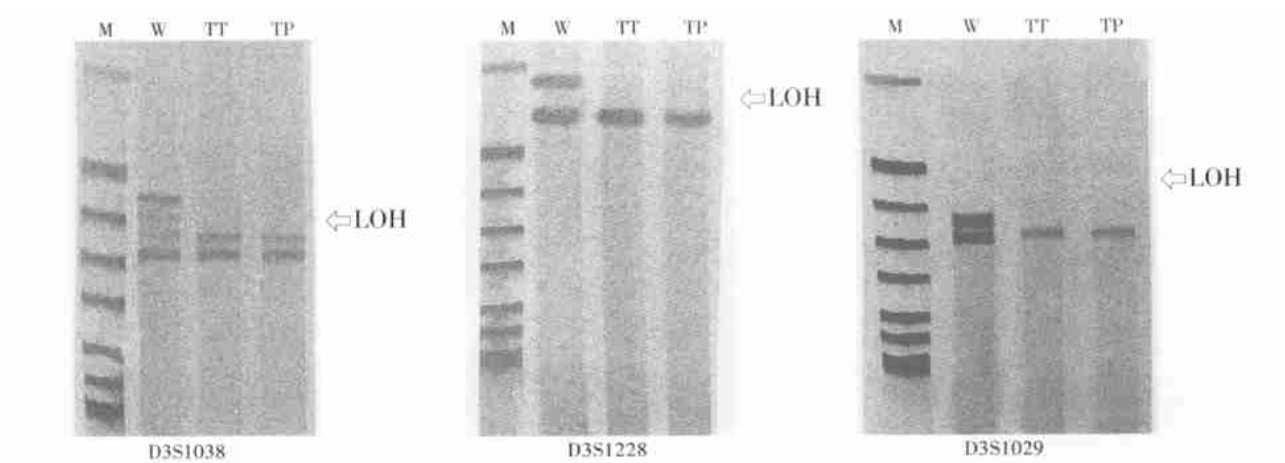


图 1　**NSCLC 3p LOH 图谱**

Fig 1　LOH on chromosome 3p in NSCLC

M: Marker; TT: Tumor tissue; TP: Plasma; W: White blood cell

2.3　LOH 情况

27 例病理组织标本 LOH 的发生率为 63%(17/ 27), 17 例病理组织阳性的病例中血浆游离 DNA 同时发生 LOH 的百分率为 84. 4%(14/ 17); 76 例 NSCLC 患者血浆游离 DNA LOH 的发生率

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

为64.5%(49/76)。15例健康对照组中未检测到LOH。3个微卫星位点编号、位置,具体LOH的例数、百分率见表2。

表2 不同位点的LOH

Tab 2 The frequencies of LOH at different loci

Locus	LOH of Tissue	LOH of plasma in tissue positive	LOH of plasma
D3S1038	33.3%(9/27)	55.9%(5/9)	31.6%(24/76)
D3S1029	40.7%(11/27)	81.2%(9/11)	26.3%(20/76)
D3S1228	25.9%(7/27)	85.7%(6/7)	40.8%(31/76)
At least 2 loci	37.4%(10/27)	——	34.2%(26/76)

2.4 LOH与临床分期之间的关系

LOH在TNM临床分期中出现的频率(至少1个位点发生LOH)为Ⅰ期67.7%(21/31),Ⅱ期62.1%(18/29),Ⅲ期44.1%(11/25),Ⅳ期72.1%(13/18)。

3 讨论

正常人血浆中存有少量游离DNA,在胃肠道恶性肿瘤患者血浆中明显增高。我们应用酚-氯仿,紫外分光光度法联合检测了15例正常人和76例NSCLC患者血浆中的游离DNA的浓度(肿瘤病例与正常对照需要同批DNA提取和含量测定,才具有可比性),发现NSCLC患者的游离DNA的浓度为0~3 000 ng/ml,平均为(400±25)ng/ml;而正常人则为0~100 ng/ml,平均为(18±3)ng/ml;两者差异显著,$P<0.01$。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,在病理组织中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%),故非常适合于恶性肿瘤的基因诊断[2]。文献报道乳腺癌、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76例NSCLC患者血浆中有49例至少1个微卫星位点可以检测到LOH,阳性率为64.5%,证实血浆微卫星LOH的检测在NSCLC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例正常人中无一例发生了LOH,表明在NSCLC患者血浆中一样具有肿瘤特异性。同时我们对照研究了27例组织标本和血浆标本。27例组织标本中有17例至少1个位点发生了LOH(63%),在这17例中有14例的血浆中检测到相同的LOH(84.4%),证明组织标本和外周血浆具有明显的一致性。

血浆游离DNA LOH与NSCLC临床分期的关系,目前尚无研究。我们的研究发现Ⅰ~Ⅳ期(TMN分期)的阳性率略有差异,但无统计学意义($P>0.05$)。由于Ⅰ期即有62.1%的阳性率,提示有较强的早期诊断意义。

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;Soaai等[7]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。

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(有创性、复杂性,早期取材困难等)。我们的研究表明,血浆游离DNA 3p部位的LOH在NSCLC诊断中的有较高的诊断价值;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广的应用前景。

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] Sillva J M, Dominguez G, Garcia J M, *et al*. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: Clinicopathological correlations[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3 251—3 256.

[4] Goessl C, Hercappell R, Munker R, *et al*. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma [J]. Cancer Reseach, 1998, 58(10): 4 728—4 732.

[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): 1 567—1 571.

[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] 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): 2 689—2 692.

(编辑 潘式文)

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