

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)11-1024-03

乳腺癌患者肿瘤循环 DNA 的定量分析

今毅¹, 谢文², 余小萍², 郑晖³(武汉大学中南医院:¹设备处,²检验科,³华中科技大学同济医学院梨园医院检验科,湖北武汉430071)

Quantitative analysis of circulating DNA in plasma from patients with breast cancer

JIN Yi¹, XIE Wen², YU Xiao-Ping², ZHENG Hui³

¹Department of Facilities, ²Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital, Wuhan University, ³Department of Clinical Laboratory, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430071, China

【Abstract】 AIM: To quantify the circulating DNA and detect the variation of 5' CpG hypermethylation in p16 gene in plasma from patients with breast cancer. **METHODS:** Blood samples were collected from 61 breast cancer patients, and 33 patients with non-neoplastic breast diseases, and 27 healthy volunteers. The circulating DNA was extracted and analyzed by fluorescent dye (SYBR green I) staining. Using a modified semi-nested methylation-specific PCR (MSP), the status of methylation of p16 gene was detected in circulating plasma DNA and corresponding breast cancer tissues. **RESULTS:** The circulating DNA concentration in the breast cancer was (65.0 ± 45.3) μg/L, significantly higher than that in the patients with non-neoplastic breast diseases (19.0 ± 9.5) μg/L and that in the normal controls [(13.0 ± 7.3) μg/L, $P < 0.05$]. Methylated p16 gene was found in 44.3% (27/61) circulating DNA and in 46.2% tissues of breast cancer, and there was no significant difference between them ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** Circulating DNA in plasma may become an additional tumor marker for the diagnosis of breast cancer.

【Keywords】 breast neoplasms; circulating DNA; neoplasms; p16 gene; methylation; tumor markers; biological

【摘要】目的 检测乳腺癌患者肿瘤循环 DNA 的含量及其 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态的改变。方法 收集 61 例乳腺癌患者、33 例乳腺良性病变患者和 27 例健康志愿者的血浆样本, 抽提血浆循环 DNA, 以 SYBR green I 荧光染色法行 DNA 定量, 利用半巢式甲基化特异性 PCR 技术, 检测 61 例乳腺癌患者血浆循环 DNA 和相应癌组织 p16 基因 5' CpG 岛甲基化

状态的改变。结果 乳腺癌患者、乳腺良性病变患者、健康自愿者肿瘤循环 DNA 浓度分别为 (65.0 ± 45.3), (19.0 ± 9.5) 和 (13.0 ± 7.3) μg/L。乳腺癌患者血浆循环 DNA 浓度显著高于乳腺良性病变患者和健康自愿者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。61 例乳腺癌患者血浆循环 DNA 和相应癌组织 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态的改变检出率分别为 44.3% 和 46.2%, 两者检出率无统计学差别 ($P > 0.05$)。结论 血浆肿瘤循环 DNA 的定量有可能成为一种新的恶性肿瘤标志物。

【关键词】 乳腺肿瘤; DNA; 肿瘤; p16 基因; 甲基化; 肿瘤标志; 生物学

【中图分类号】R737.9

【文献标识码】A

0 引言

随着近年来肿瘤细胞生物学及分子生物学的深入研究, 以及分子生物学检测技术的快速发展, 外周血肿瘤标记由于检测的方便和非侵入性已逐步替代了受到标本采集以及无法连续监测和随访追踪等诸多限制的组织学肿瘤标记。而外周血循环 DNA 及其改变的分子生物学检测正以其不可替代的优点逐渐被人们所重视, 并成为肿瘤细胞生物学及分子生物学研究中引人注目的一个亮点^[1-4]。循环 DNA 是存在于血清和血浆中的游离 DNA。近年来, 日益增多的研究表明, 肿瘤在生长过程中能持续释放肿瘤细胞 DNA 进入外周血液。健康人体的血清及血浆中只含有极少量的循环 DNA, 在炎症及肿瘤患者外周血中循环 DNA 的浓度增加, 伴有转移的肿瘤患者其浓度更高于早期患者^[5-7]。对循环肿瘤 DNA 的检测可分为定性和定量两种: 前者主要检测血清和血浆中肿瘤特异性基因的改变, 后者则检测血清和血浆的 DNA 总量, 两者均可反映肿瘤的存在和严重程度。我们从定量(检测肿瘤循环 DNA 的含量)和定性(检测肿瘤循环 DNA 的 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态的改变)两方面入手, 对乳腺癌患者肿瘤循环 DNA 含量及其 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态的改变进行了研究。

1 对象和方法

1.1 对象 武汉大学中南医院妇科和肿瘤科在 2005-08/2006-05 收治的 61 例乳腺癌患者, 诊断均经组织病理学证实。33 例乳腺良性病变患者为本院妇

收稿日期 2007-01-26; 接受日期 2007-04-02

作者简介: 今毅, 学士, 主管技师。Tel: (027) 67813027 Email: xiewen1967@sina.com

产科同一时期收治的,排除其他病变。27 健康对照来自本院体检中心,体检正常,无疾病在身。QIAamp DNA Blood Midi Kit 购自 Qiagen 公司,荧光染料 SYBR green I 购自 Molecular Probes 公司,标准量 DNA 购自 Invitrogen 公司,Wizard DNA Purification Resin 购自 Promega 公司,PCR 扩增仪为 BIO-RAD 公司,电泳仪、凝胶成像系统为北京六一电子仪器设备厂,FR2200 紫外投射仪与可见分析装置为上海复日科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 所有乳腺癌病例取静脉血 5 mL 置于 EDTA 抗凝管中,以 3000 r/min,离心 10 min 后将上清血浆部分吸至洁净离心管,再离心 10 min,完全去除血细胞成分后置于干燥洁净冻存管中,-80℃ 低温冰箱保存备 DNA 抽提。相同方法采集保存 33 例乳腺良性病变、27 名健康志愿者的血液样本。

1.2.2 血浆 DNA 抽提和纯化 血浆 DNA 的抽提严格按照 QIAamp DNA Blood Midi Kit(Qiagen 公司,德国)试剂盒的操作步骤进行,每 2 mL 血浆获得 300 μ L 的 DNA。所有保存血浆标本均采用同一批号的试剂盒抽提 DNA 以减少批间误差并统一集中检测。

1.2.3 血浆 DNA 定量 取 10 μ L 血浆 DNA 置透明载板,与 1:3000 荧光染料 SYBR green I (Molecular Probes 公司,美国)等比例稀释并充分混匀后置于紫外与可见光成像分析系统中,在激发光波长为 345 nm,吸收波长 500 nm 的条件下摄影获取图像,经软件系统分析读取其发光强度。将检测所得不同样本 DNA 的发光强度代入根据标准含量 DNA 的发光强度所作的回归方程,分别计算出其相应的 DNA 浓度。如果样本发光强度超过标准 DNA 发光强度范围,则将样本稀释后再进行定量,直到所测值在标准浓度范围内。每次对同一血浆样本检测 3 次,取其平均值。

1.2.4 肿瘤组织 DNA 的提取 取约 0.5 g 冷冻组织立即放入液氮中磨碎成粉末状,加入到 10 倍体积的 DNA 抽提缓冲液中,边加边摇,混匀后置于 50℃ 水浴 1 h,再加蛋白酶 K 至终浓度为 100 mg/L 放入 50℃ 水浴 3 h 根据水解情况确定是否再加。全溶解后加蛋白酶(终浓度 20 mg/L)37℃ 水浴 1 h,以等体积的饱和酚来回轻轻颠倒 10 min,4000 r/min 离心 10 min,吸取上清至另一塑料管中,然后以酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)及氯仿:异戊醇(24:1)比例各抽提一次。加 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠及 2~2.5 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA,然后用 700 mL/L(V/V)乙醇洗涤 DNA 3 次,室温下干燥,加适量 TE 溶解。DNA -20℃ 下保存,以作为模板 DNA 扩增。

1.2.5 引物设计 引物序列:U 上游 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3',下游 5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3';M 上游 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3',下游 5'-GAC CCC GAA ACC GCG ACC GTA A-3';其中 U 为非甲基化引物,M 为甲基化引物。

1.2.6 DNA 甲基化修饰和纯化 取已提取的血浆或肿瘤组织 DNA 50 μ L,加入 50 μ L 0.2 mol/L NaOH,于 37℃ 变性 10 min,加入 10 mmol/L 对苯二酚 30 μ L,再加入 520 μ L 3 mol/L NaHSO₃,50℃ 水浴 16 h 进行甲基化修饰,水浴完毕后准备纯化 DNA。甲基化修饰后的 DNA 采用 Wizard DNA Purification Resin(Promega 公司)纯化试剂盒,严格按照试剂盒操作步骤进行。

1.2.7 半巢式甲基化特异性 PCR 反应 PCR 反应体系:Taq DNA 聚合酶 25 μ L,模板 DNA 2.5 ng,引物 1(20 μ mol/L)1 μ L,引物 2(20 μ mol/L)1 μ L,200 μ mol/L dNTPs 1 μ L,灭菌蒸馏水加至 50 μ L。PCR 反应条件:95℃ 12 min;95℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 60 s 共 35 个循环;72℃ 延长 10 min。

统计学处理:全部资料用 SPSS 11.0 软件分析,计数资料采用 χ^2 检验进行组间比较,计量资料采用非参数秩和检验 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆循环 DNA 浓度的检测 乳腺癌患者为(65.0 \pm 45.3) μ g/L,乳腺良性病变患者(19.0 \pm 9.5) μ g/L,健康自愿者(13.0 \pm 7.3) μ g/L。乳腺癌患者血浆循环 DNA 浓度显著高于乳腺良性病变患者和健康自愿者,差异在统计学上有显著性($P < 0.05$)。

2.2 血浆循环 DNA 浓度作为乳腺癌诊断标准的敏感度及特异度 应用受试者工作特性曲线(ROC)对乳腺癌患者组和两对照组(乳腺良性病变组、健康自愿者组)进行了分析。采用 19 μ g/L 作为诊断乳腺癌的临界值,结果显示在健康人群中检测乳腺癌的敏感度为 95.1%,特异度为 88.9%,ROC 曲线下面积(AUC)为 0.946 95% CI 为 0.876~0.983(图 1)。采用 22 μ g/L 作为诊断乳腺癌的临界值,结果显示在乳腺良性病变人群中检测乳腺癌的敏感度为 93.4%,特异度为 66.7%,AUC 为 0.845,95% CI 为 0.756~0.912(图 1)。

2.3 乳腺癌患者血浆循环 DNA p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态改变的检测 为了证实血浆肿瘤循环 DNA 的特性,我们对 61 例乳腺癌患者血浆循环 DNA

的 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态变化进行了检测。半巢式甲基化特异性 PCR 分析结果显示:61 例乳腺癌患者血浆循环 DNA 有 27 例 p16 基因 5' CpG 岛甲基化,甲基化率 44.3%,其相应的肿瘤组织 DNA 有 28 例 p16 基因 5' CpG 岛甲基化,甲基化率 46.2%,两者检出率无统计学差别 ($P > 0.05$)。血浆循环 DNA 具有肿瘤特性的相关基因。

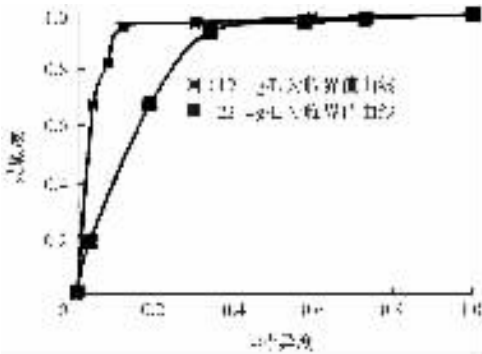


图1 乳腺癌患者组和乳腺良性病变组及健康自愿组的血浆循环 DNA ROC 曲线

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,治疗上早期诊断是一个关键环节。血中游离 DNA 和 p16 基因 5' CpG 岛甲基化的检测为乳腺肿瘤的早期诊断提供了一种新的简便途径。

已证实肿瘤患者血清 DNA 水平大大高于正常人^[8-9]。研究表明乳腺癌在发生过程中除 DNA 序列改变外, DNA 甲基化的表遗传性的改变早于恶性表型的出现并且具有肿瘤的独特性,启动子的高甲基化是抑癌 P16 基因在乳腺肿瘤中失活的机制之一。本实验中 61 例乳腺癌患者血浆循环 DNA 及其相应的肿瘤组织 DNA 甲基化检出率分别为 44.3% 和 46.2%,两者检出率无统计学差别 ($P > 0.05$)。这证明 p16 基因 5' CpG 岛甲基化状态具有肿瘤特异性,并且循环血中 DNA 和肿瘤组织中表达的基因一致。

本实验我们采用 SYBR green I 荧光染色法研究了不同组别血浆循环 DNA 的浓度。结果显示:乳腺癌患者血浆循环 DNA 浓度 (65.0 ± 45.3) $\mu\text{g/L}$ 显著高于乳腺良性病变患者 (19.0 ± 9.5) $\mu\text{g/L}$ 和健康自愿者 (13.0 ± 7.3) $\mu\text{g/L}$,差异在统计学上有显著性 ($P < 0.05$)。上述结果表明,与正常对照组相比,恶性肿瘤患者循环 DNA 水平明显升高,循环 DNA 的含量检测对肿瘤的诊断有一定的价值,其可能是肿瘤诊断的一个重要生物学指标。

本研究我们构建了 ROC 曲线来评价循环 DNA 定量的敏感度及特异度,以此确定诊断乳腺癌的截断

(cut-off)值。结果发现:分别采用 19 $\mu\text{g/L}$ 和 22 $\mu\text{g/L}$ 作为正常人群组和具有高危性的乳腺良性病变患者组诊断乳腺癌的临界值时,敏感度及特异度各不相同。因此,循环 DNA 检测适合作为临床诊断乳腺癌指标,但在不同受试人群中需根据检查目的使用不同的截断 (cut-off) 值。

以循环 DNA 为基础的核酸分析对于探测肿瘤特异的细胞外 DNA,是一种新的、有潜在价值的癌症检测和监测方法。当然,迄今仍没有足够的证据显示^[10] 细胞外核酸能代替细胞内。但循环中的癌基因或相关 DNA 的检测对于癌症的筛选、诊断和监测有重要的意义,血浆肿瘤循环 DNA 有可能成为一种新的恶性肿瘤标志物。

【参考文献】

- [1] Chiu RW, Chan LY, Lam NY, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma [J]. Clin Chem, 2003, 49(5):719-726.
- [2] Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(21):3902-3908.
- [3] Taback B, O'Day SJ, Hoon DS. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients [J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1022:17-24.
- [4] Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26):4270-4276.
- [5] Koyanagi K, Mori T, O'Day SJ, et al. Association of circulating tumor cells with serum tumor-related methylated DNA in peripheral blood of melanoma patients [J]. Cancer Res, 2006, 66(12):6111-6117.
- [6] Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients [J]. Cancer Res, 2001, 61(12):4675-4678.
- [7] Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assay [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(24):1848-1850.
- [8] Yu SC, Lo DY, Ip CB, et al. Does percutaneous liver biopsy of hepatocellular carcinoma cause hematogenous dissemination? An *in vivo* study with quantitative assay of circulating tumor DNA using methylation-specific real-time polymerase chain reaction [J]. Am J Roentgenol, 2004, 183(2):383-385.
- [9] Mori T, O'Day SJ, Umetani N, et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(36):9351-9358.
- [10] Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis [J]. Science, 1965, 148:374-376.