

血清循环 DNA 定量检测在卵巢癌诊断中的应用价值*

刘丽荣¹, 文春蓉², 梁璐², 刘咏梅¹, 朱丽英¹

(1. 贵州医科大学 医学检验学院 临床血液学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳市妇幼保健院 检验科, 贵州 贵阳 550003)

[摘要] 目的: 探讨血清循环 DNA(cDNA)定量检测在卵巢癌患者诊断中的应用价值。方法: 以 252 例经病理证实的上皮性卵巢癌患者为卵巢癌组, 100 例卵巢良性肿瘤患者作为良性对照组, 健康体检者 100 例作为健康对照, 以微量基因组抽提试剂盒抽提 3 组患者血清 DNA, 用实时荧光定量 Real-time PCR 测定其含量。结果: 良性对照组和健康对照组相比, 血清 cDNA 比值差异无统计学意义($P > 0.05$); 与良性对照组和健康对照组相比, 卵巢癌组血清 cDNA Ct 值减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 上皮性卵巢癌 I、II、III 期血清 cDNA Ct 值差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 IV 期与 I 期比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 定量检测上皮性卵巢癌患者血清 cDNA, 有望成为临床辅助诊断卵巢癌的新手段。

[关键词] 血清学; DNA; 卵巢肿瘤; 诊断技术与方法

[中图分类号] R737.31; R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)05-0543-03

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.012

Clinical Application Value of Quantitative Detection of Serum Circulating DNA in Diagnosis of Ovarian Cancer

LIU Lirong¹, WEN Chunrong², LIANG Lu², LIU Yongmei¹, ZHU Liying¹

(1. Department of Clinical Hematology, the College of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guiyang Women and Children Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore application value of quantitative detection of serum circulating DNA(cDNA) in diagnosing ovarian cancer. **Methods:** 252 cases of pathologically confirmed patients with epithelial ovarian cancer were enrolled as ovarian cancer group, 100 cases of patients with benign ovarian cancer as benign control group, and 100 healthy people as healthy control group. Micro-genomic DNA extraction kit was adopted to extract the serum circulating DNA from the three groups and Real-time fluorescence quantitative PCR was adopted to detect the serum cDNA level. **Results:** There was no significantly statistical difference in level of serum cDNA between benign control group and healthy control group. There was significantly statistical difference in level of serum cDNA between ovarian cancer group and benign control group or between ovarian cancer group and healthy control group($P < 0.05$). In different clinical stage epithelial ovarian cancer, there was no difference in level of serum cDNA. **Conclusion:** Quantitative detection of serum cDNA of patients with ovarian cancer might be a novel auxiliary method for diagnosis of ovarian cancer.

[Key words] serology; DNA; ovarian cancer; diagnosis technique and method

卵巢癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一, 发病率占妇科恶性肿瘤的第 3 位, 死亡率占各类妇科恶性肿瘤之首, 对妇女生命造成了严重威胁。卵

巢癌的诊断常处于晚期, 且大多数初诊患者已伴盆、腹腔转移。目前, 卵巢癌的筛查诊断、疗效观察及预后判断等, 仍主要依靠腹腔镜检查、组织病理

*[基金项目] 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字(2011)2233 号]

网络出版时间:2016-05-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2108.034.html>

学检查、血清肿瘤标记物(如 CA125、癌胚抗原等)的检测及影像学检查,前两者对卵巢癌的敏感性高,但是具有创伤性,影像学检查虽无创伤性,但却容易造成漏诊。循环 DNA(circulating DNA, cDNA)是一种存在于动植物和人体液中的无细胞状态的胞外 DNA,由细胞受外源性刺激后主动分泌,细胞损伤或死亡后释放产生^[1]。研究表明,外周血 cDNA 一部分以游离形式存在于血清中,另一部分通过与蛋白质结合成复合体的形式附着在血细胞表面^[2]。正常人血液中也存在微量 cDNA,某些病理状态下, cDNA 会有不同程度的增高,尤其肿瘤患者血液 cDNA 浓度明显高于正常人^[3]。目前临床上关于抽取卵巢癌患者的血清检测 cDNA 含量的报道甚少。因此血清 cDNA 检测用于卵巢癌的早期诊断具有明显的优势和极大的潜力。故本研究通过定量检测卵巢癌患者血清 cDNA 水平,以探索检测血清 cDNA 水平可否成为用于辅助卵巢癌早期诊断的新方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2013 年 7 月~2015 年 2 月经临床病理检查确诊为上皮性卵巢癌患者 302 例,其中 I 期肿瘤 57 人, II 期 73 人, III 期 94 人, IV 期 26 人;卵巢良性肿瘤患者和健康成年女性各 100 例血清标本,分别于 -80℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 血清 cDNA 的提取 取 600 μL 血清标本,用微量基因组 DNA 抽提试剂盒(北京天根生物有限公司),按操作说明书抽提血清 DNA,用 ELX800 酶标仪(Bio-tec, 美国)测定各样品吸光度值(A₂₆₀/A₂₈₀),计算 DNA 含量和纯度。

1.2.2 血清 DNA Ct 值的测定 PCR 引物参照文献^[4]设计,以看家基因 GAPDH 为目的基因,引物序列为 5'-ATGGTGCTGAAGA-CGCCAGT-3', 5'-GCACCGT-CAAGGCTGAGAAC-3' 扩增长度为 142 bp,由上海生工生物工程公司合成。反应体系含定量 PCR Master Mix 10 μL , 上下游引物各 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , 加水补足至 25 μL 。反应采用两步法,条件为: 95℃ 2 min, 95℃ 30 s, 55℃ 1 min, 35 个循环。用 Bio-Rad CFX 96™ 荧光定量 PCR 分析系统进行定量检测,并作熔解曲线分析,根据各自设定的临

界值的循环数(Ct)值,对 cDNA 的原始拷贝数进行定量,每个血清 DNA 样品重复测定 3 次取均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计分析,计量资料先进行正态性检验,样本成正态分布时,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GAPDH 基因熔解曲线

熔解曲线显示 GAPDH 的扩增反应具有良好的特异性(图 1),证明实时荧光定量 Real-time PCR 测定检测具有高度准确度和可靠性。

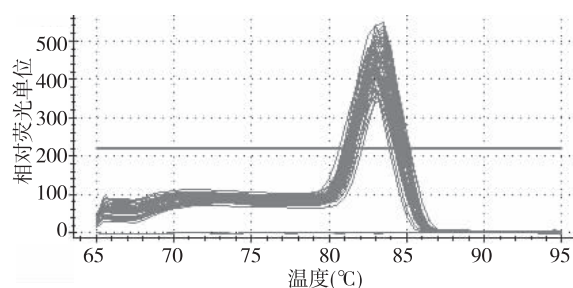


图 1 GAPDH 基因熔解曲线

Fig. 1 Melt Curve of gene GAPDH

2.2 血清 cDNA 的 Ct 值

良性对照组 cDNA 与健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);卵巢癌患者各组与健康对照组、正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);cDNA 含量水平随卵巢癌临床分期增加呈增高的趋势,上皮性卵巢癌 I、II、III 期各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),上皮性卵巢癌 IV 期组与 I 期组比较, cDNA 含量差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

卵巢癌患者的治疗疗效以及延长生存期的主要关键因素取决于早期诊断,因此当今急需建立新的早期检测手段。近年来随着肿瘤分子生物学的飞速发展,人们已初步发现肿瘤患者血清 DNA 浓度显著高于正常人群,并提示体液(包括血清、血浆及腹水)DNA 中高频遗传学标志变异的检测对于监控疾病具有一定的临床意义^[5-8]。卵巢癌

表 1 各组血清 cDNA 的 Ct 值($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Comparison of Ct values of circulating serum DNA detected in different groups

组别	n	Ct 值
健康对照组	100	27.53 ± 1.95
良性对照组	100	24.91 ± 1.28 ⁽¹⁾
卵巢癌组		
I 期	57	22.98 ± 2.07 ⁽¹⁾⁽²⁾
II 期	73	22.02 ± 1.54 ⁽¹⁾⁽²⁾
III 期	94	21.27 ± 1.92 ⁽¹⁾⁽²⁾
IV 期	26	19.26 ± 1.09 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

⁽¹⁾ 与健康对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与良性对照组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾ 与上皮性卵巢癌 I 期组比较, $P < 0.05$

是女性生殖器官常见的肿瘤之一,发病率仅次于宫颈癌和宫体癌而列居第 3 位,约占女性全身恶性肿瘤的 4%。但因卵巢癌致死率,却占各类妇科肿瘤的首位,对妇女生命造成严重威胁,对卵巢癌的早期诊断十分重要。卵巢癌的临床分期根据 1987 年国际妇产科联盟(FIGO)国际分期法可分为如下 4 期: I 期,肿瘤局限于卵巢; II 期,病变累及一侧或双侧卵巢,伴盆腔转移; III 期,肿瘤侵及一侧或双侧卵巢,伴盆腔以外腹膜种植或腹膜后或腹股沟淋巴结转移;肝脏表面转移; IV 期,肿瘤侵及一侧或双侧卵巢并有远处转移,胸水存在时需找到恶性细胞,肝转移累及肝实质。

cDNA 是一种存在于外周血,滑膜液和脑脊液中无细胞状态的 DNA,主要是由单链或双链 DNA 混合组成,以 DNA 蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在。cDNA 的研究分为定性和定量两种,定性主要检测血清或血浆中肿瘤特异性基因改变,定量检测则以血 cDNA 总量为指标,两者均可以反应肿瘤的存在及其严重程度。对于血 cDNA 来源有几种推测: (1) 肿瘤细胞的坏死和凋亡释放大量 DNA; (2) 循环血或微转移灶中肿瘤细胞溶解释放 DNA; (3) 肿瘤细胞自身向周围释放 DNA; (4) 肿瘤浸润周围正常组织细胞、组织变性释放 DNA。

本研究中,利用灵敏度极高的实时荧光定量 Real-time PCR 技术,定量检测健康体检者、卵巢良性肿瘤患者及卵巢癌患者血清 cDNA^[9]。结果显示,各期卵巢癌患者血清 cDNA 均明显高于健康体检者和卵巢良性肿瘤患者,提示血清 cDNA 含量检测对卵巢癌的诊断具有重要参考价值。对 cDNA

含量与卵巢癌临床分期关系的分析显示,随着临床分期的增加,血清 cDNA 含量逐渐增高,提示卵巢癌各期 cDNA 含量会显著增高,但与卵巢癌分期无明显相关性; IV 期 cDNA 含量显著高于前 3 期,提示卵巢癌晚期 cDNA 含量会进一步显著增高。

综上所述,随着各种分子生物学技术快速发展和广泛应用,利用灵敏度极高的实时荧光定量 PCR 技术,定量检测卵巢癌患者血清 cDNA 具有简单易操作,创伤小等优点,对于手术后的患者无法取组织检测化验,可助其实时监测手段。作为一种微创而便捷的辅助手段,在卵巢癌的早期诊断、临床分期、疗效评估和预后判断等方面具有较高的应用价值。

4 参考文献

[1] Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, et al. Detection of circulating tumor DNA in the blood(plasma/serum) of cancer patients[J]. Cancer Metastasis Rev, 1999(1):65 - 73.

[2] 赵心亮,田广明,田亚平. 人体循环游离 DNA 应用的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2013(2):109 - 114.

[3] 闫巍. 肿瘤循环 DNA 的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2013(4):359 - 362.

[4] 孙朝晖,石玉玲,危敏,等. 血浆循环 DNA 检测在鼻咽癌诊断研究中的应用[J]. 华南国防医学杂志, 2009(3):49 - 51.

[5] 倪培民,孙然,王雷,等. 恶性肿瘤循环 DNA 的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2011(1):172 - 174.

[6] 彭亮,娄晓丽,侯彦强. 循环 DNA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013(18):2424 - 2426.

[7] 张世强,王保庆,王海清,等. 非小细胞肺癌患者血清游离 DNA 定量检测的临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2014(10):944 - 946.

[8] 吴晓鸿,吴乃文,刘惜时. 血清 DNA 定量在上皮性卵巢癌诊断中的应用研究[J]. 中国妇幼保健, 2009(10):1413 - 1415.

[9] 王俊宏,潘世扬,黄佩君,等. 荧光定量聚合酶链反应肺癌患者血清循环 DNA 的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2003(12):791.

(2016-01-12 收稿,2016-04-25 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 刘 华