

基于PPIA序列检测结直肠癌患者血液游离DNA的临床意义

梁鸿斌¹, 周婉瑜², 冯伟龙¹, 曾祥胜¹, 陈新彬¹, 吴锦顺¹, 祝 琰¹ (1. 珠海国际旅行卫生保健中心, 广东珠海 519100; 2. 遵义医科大学第五附属<珠海>医院, 广东珠海 519100)

摘要: **目的** 建立基于肽基脯氨酰异构酶A(PPIA)序列检测结直肠癌(CRC)患者血液游离DNA(cf-DNA)方法并探讨其临床意义。**方法** 设计特异性引物并利用荧光定量PCR技术建立血液游离DNA检测方法, 定量检测结直肠癌患者(A组)、结直肠息肉患者(B组)和健康对照者(C组)各30例的cf-DNA水平; 比较肿瘤患者不同TNM分期cf-DNA水平。**结果** PPIA116扩增曲线: $y = -3.936x + 11.415$, $R_2 = 0.995$, 扩增效率79.5%。PPIA溶解温度为80.00℃, 批内CV 0.83%~0.87%, 重复性良好。cf-DNA水平: A组最高, B组次之, C组最低($P < 0.01$)。不同TNM分期患者cf-DNA水平差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或0.05)。**结论** 基于PPIA序列定量检测cf-DNA具有可行性, 监测cf-DNA有助于CRC诊断和分期。

关键词: PPIA序列; 结直肠癌; 游离DNA

中图分类号: R 735.3

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)06-0686-03

PPIA sequence-based detection and clinical significance of serum free DNA in patients with colorectal cancer

LIANG Hong-bin¹, ZHOU Wan-yu², FENG Wei-long¹, ZENG Xiang-sheng¹, CHEN Xin-bin¹, WU Jin-shun¹, ZHU Ya¹ (1. Zhuhai International Travel Healthcare Center, Zhuhai 519000, China; 2. Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: **Objective** To establish a peptide prolyl isomerase A (PPIA) sequence-based method for detection of cell-free DNA (cf-DNA) and explore its clinical significance in patients with colorectal cancer (CRC). **Methods** cf-DNA levels in 30 patients with CRC (group A), 30 with colorectal polyps (group B) and 30 healthy controls (group C) were determined by fluorescence quantitative PCR using specific primers, and then compared among different TNM stages. **Results** Amplification curve of PPIA 116 was $y = -3.936x + 11.415$, $R_2 = 0.995$, and amplification efficiency was 79.5%. Melting temperature of PPIA was 80.00 °C, and CV per batch was 0.83%-0.87%, with good repeatability. cf-DNA levels were highest in group A, moderate in group B, and lowest in group C ($P < 0.01$). cf-DNA contents were significantly different among different TNM stages ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion** PPIA sequence-based detection of cf-DNA is feasible. cf-DNA levels are helpful for diagnosis and staging of CRC.

Key words: PPIA sequence; colorectal cancer; cell-free DNA

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率有逐年上升趋势, 且其恶性程度高, 病死率仅次于肺癌与胃癌^[1], 但CRC早期隐匿性强, 糖链抗原19-9(CA19-9)、癌胚抗原(CEA)及CA153等肿瘤标记物是目前早期筛查CRC的重要手段, 有助于CRC的早期诊断, 但其灵敏度和特异度不高^[2-3]。血液游离DNA(cf-DNA)是无细胞状态的胞外DNA, 既往报道显示cf-DNA来源于肿瘤细胞的微转移灶释放, 而在健康人群中含量极低^[4]。本研究回顾性分析90例基于肽

基脯氨酰异构酶a(PPIA)序列定量检测cf-DNA患者的临床资料, 探讨cf-DNA在CRC诊疗中的应用价值。

1 资料和方法

1.1 临床资料

纳入2019年1月-10月90例在遵义医学院第五附属(珠海)医院和我中心门诊部就诊接受PPIA序列检测血液cf-DNA的患者作为研究对象, 所有病例均经病理活检确诊, 结直肠息肉符合世界卫生组织推荐标准^[5-6], 且病历资料完整。排除标准: (1)合并有其他原发性恶性肿瘤者; (2)CRC复发患者; (3)既往有结直肠手术病史或肝肾功能严重不全者。本研究经医院伦理委员会批准。根据纳入病例类型不同将

基金项目: 珠海市科技计划项目(No.20181117E030011)

收稿日期: 2020-02-09; 修订日期: 2020-05-14

作者简介: 梁鸿斌(1975-), 男, 本科, 副主任医师

90例接受血液检测的研究对象分为A组(30例, CRC)、B组(30例, 结直肠息肉)及C组(30例, 体检健康者)。A组男19例, 女11例; 年龄(49.9 ± 10.5)岁; 身体质量指数(BMI)为(20.1 ± 2.1) kg/m^2 。B组男22例, 女8例; 年龄(48.9 ± 9.8)岁; BMI(21.2 ± 1.9) kg/m^2 。C组男17例, 女13例; 年龄(50.2 ± 8.7)岁; BMI (20.6 ± 1.9) kg/m^2 。A、B、C组患者的性别、年龄及BMI的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

1.2 检测方法

采用DNASar软件对PPIA基因序列进行分析, 再以PrimerSelect软件在基因保守区域设计并筛选检测引物, 筛选出最优引物序列为PPIA-116F: AAG AAG TGA CTG CTC ATC TA, PPIA-116R: AAG CAC TGC TGCACG ATC A。体外合成PPIA基因片段(GenBank NG_029697, 7121-8080nt)作为阳性对照。收集到的研究对象血清样本按核酸提取试剂说明书提取血清游离核酸, -20°C 保存备用。PCR反应体系为buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL , dNTPs(各2.5 mmol/L) 2.0 μL , rTaq DNA聚合酶(5 U/ μL)0.25 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各1 μL , SYBR Green 1 μL , 模板2 μL , ddH₂O补足至25 μL 。反应条件为95 $^\circ\text{C}$ 预变性5 min, 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 40个循环; 65至95 $^\circ\text{C}$ 收集荧光绘制溶解曲线。

1.3 统计学处理

选用SPSS 20.0软件包对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行重复测量的方差分析及 q 检验, 计数资料以百分比表示, 组间比较行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 线性

用DNA浓度测量仪(NANODROP 2000)测得DNA模板PPIA质粒质量浓度2.5 g/L, 把质量浓度为2.5 g/L的PPIA标准品10倍梯度稀释($2.5 \sim 2.5 \times 10^{-7}$ g/L)后扩增曲线见图1, 绘制标准曲线(图2)。经计算, $y = -3.936x + 11.415$, $R^2 = 0.995$, 扩增效率为79.5%, 线性良好。

2.2 特异性

如图3可见, 荧光定量PCR溶解曲线单峰特异, PPIA溶解温度为80.00 $^\circ\text{C}$ 。

2.3 重复性

以PPIA质粒质量浓度为0.025、 25×10^{-5} g/L的DNA标准液, 同一质量浓度重复做10个测定, 批内

CV 0.83%~0.87%, 说明重复性良好, 见表1。

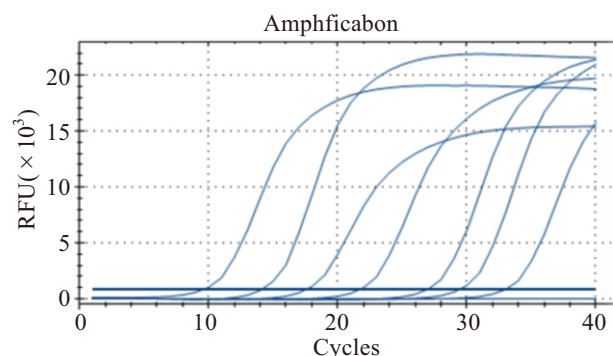


图1 PPIA116扩增曲线

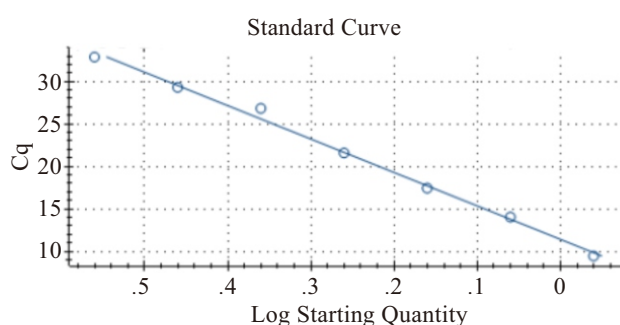


图2 PPIA116扩增的标准曲线

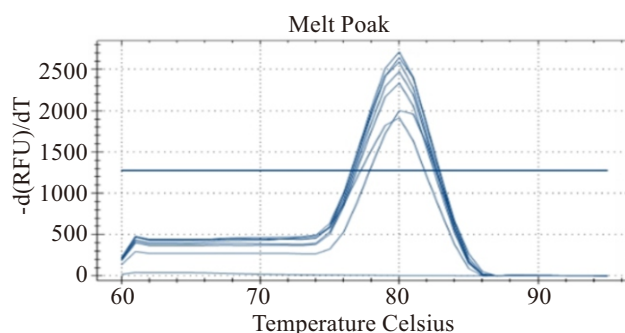


图3 PPIA116bp扩增的溶解曲线

表1 检测的批内变异系数 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

质量浓度/ (g/L)	实验次数	PPIA116	
		均数 $\pm$ 标准差	批内CV/%
0.025	10	19.28 ± 0.16	0.83
2.5×10^{-5}	10	29.92 ± 0.26	0.87

2.4 cf-DNA水平

A、B、C组患者的cf-DNA水平分别为(413.16 ± 104.43)、(276.33 ± 97.46)、(89.69 ± 24.37) $\mu\text{g/L}$, 3组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 不同肿瘤分期结直肠癌患者cf-DNA水平

不同T分期患者cf-DNA水平差异具有统计学意义($P < 0.01$), T₃、T₄期结直肠癌患者的cf-DNA水平均高于T₁、T₂期结直肠癌患者($P < 0.01$); 不同N分期

患者cf-DNA水平差异具有统计学意义($P<0.01$), N₁、N₂期结直肠癌患者的cf-DNA水平均高于N₀期结直肠癌患者义($P<0.01$), 不同M分期患者cf-DNA水平差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表2。

表2 不同肿瘤病理特征结直肠癌患者cf-DNA水平

病理分期		<i>n</i>	cf-DNA/(μg/L)
T分期	T ₁	6	149.03 ± 66.79
	T ₂	10	204.48 ± 58.29
	T ₃	9	325.09 ± 78.83 ^{ab}
	T ₄	5	408.21 ± 95.07 ^{ab}
N分期	N ₀	9	164.15 ± 85.16
	N ₁	13	294.76 ± 101.34 ^c
	N ₂	8	379.49 ± 122.09 ^c
M分期	M ₀	21	289.67 ± 95.58
	M ₁	9	395.72 ± 103.34

与T₁比较: ^a $P<0.01$; 与T₂比较: ^b $P<0.01$; 与N₀比较: ^c $P<0.01$

3 讨论

长期以来, CRC的早期诊断是临床关注重点, cf-DNA多以DNA蛋白质复合物形式存在, 主要来源于凋亡坏死细胞, 目前有关cf-DNA释放入血的具体机制尚不明确, 有关cf-DNA与肿瘤分期的关系也有争议^[7-8]。肽基脯氨酰异构酶a(Peptidylprolyl isomerase A, PPIA)是一种能编码与细胞凋亡和坏死密切相关的酶类Cyclophilin A (Cyp A)的cf-DNA。其编码的蛋白Cyp A是高度保守广泛分布的蛋白家族, 在肿瘤生长过程中, 微血管生成也是必不可少的一个环节。以往的分子生物学的研究表明, CypA具有多种生物学功能, 与多种疾病有关, 其在辅助蛋白质正确折叠、参与免疫抑制、介导炎症反应等方面发挥重要作用, 具有参与新生血管生成、介导免疫、参与炎症反应等多种功能。实时荧光定量PCR具有较高的灵敏度、特异性, 可实现快速定量检测, 因此临床应用较为广泛, 尤其适用于肿瘤相关基因的检测。因而, 本研究以PPIA为内参基因, 选用实时荧光定量PCR技术检测血液样本中cf-DNA水平。

基于PPIA序列检测血液样本中cf-DNA浓度的方法, 其滴度稀释法检测结果显示, $y=-3.936x+11.415$, $R_2=0.995$, 其线性、特异性良好, 说明其结果可信度高; 重复性分析结果显示, 检测批内CV 0.83%~0.87%, 说明其有良好的重复性。由此可

见, 建立基于PPIA检测血液样本中cf-DNA质量浓度, 在达到较高的准确性、可信度的同时又具有较好的重复性。本研究检测结果显示, CRC患者的cf-DNA水平明显高于结直肠息肉患者和健康对照者, 且不同分期患者间的差异有统计学意义, 这与郑照正等^[9]报道一致。分析其原因可能如下: 随着肿瘤进展, 部分肿瘤细胞凋亡或被巨噬细胞吞噬, 这使大量DNA片段被释放, 进而造成cf-DNA含量上升, 提示基于PPIA序列监测患者血液cf-DNA水平具有可行性, 可作为CRC患者早期筛查; 同时肿瘤不同分期患者检测结果差异亦有统计学意义, 因此监测cf-DNA水平有助于判断CRC病理分期, 为预后判断和临床干预提供参考。但本研究随访时间较短, 且样本量较小, 不同cf-DNA患者预后差异有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李红平, 苏薇, 狄连君, 等. 2127例大肠癌临床发病特点的回顾性分析[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(12): 836-839.
- [2] 黄利军, 方佳峰, 吴珏堃, 等. 术前血清肿瘤标志物联合血常规指标对结直肠癌患者预后评估的价值[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(12): 1421.
- [3] XU C Y, LIU S Q, QIN M B, et al. SphK1 modulates cell migration and EMT-related marker expression by regulating the expression of p-FAK in colorectal cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(5): 1277-1284.
- [4] 李绵绵, 蔡锚, 余坚, 等. 应用微滴式数字PCR定量检测结直肠癌患者血浆循环游离DNA[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(13): 1579-1582.
- [5] 刘荫华, 姚宏伟, 周斌, 等. 美国肿瘤联合会结直肠癌分期系统(第8版)更新解读[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(1): 6-9.
- [6] YOKO K, SHIGETO Y, SHINJI T, et al. Computer-aided diagnosis of colorectal polyp histology by using a real-time image recognition system and narrow-band imaging magnifying colonoscopy[J]. Gastrointest Endosc, 2016, 83(3): 643-649.
- [7] 李文清, 林经安, 王铿, 等. 血浆游离DNA完整性检测对炎症性肠病患者结直肠癌变筛查的价值[J]. 中华炎症肠病杂志, 2019, 3(1): 79-82.
- [8] 高红红, 陈剑. 亲环素A在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(2): 137-139.
- [9] 郑照正, 闵丽珊, 钱福初, 等. 定量分析结直肠癌患者血浆循环游离DNA的临床价值[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(3): 529-532.